

**Analyse autoreaktiver T-Zellen zur
Identifizierung arthritogener Peptide
bei der HLA-B27-assoziierten
Reaktiven Arthritis**

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Margarete Schönwetter-Steer

München, Februar 2014



Erstgutachten: Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiss

Zweitgutachten: Herr PD Dr. Josef Mautner

Tag der Abgabe: 24.02.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
Summary.....	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Das menschliche Immunsystem	3
2.2 MHC-Moleküle	4
2.3 Der T-Zell-Rezeptor (TZR)	6
2.4 Autoimmunerkrankungen	13
2.4.1 Bedeutung von T-Zellen.....	13
2.4.2 Reaktive Arthritis (ReA).....	14
2.4.3 Bedeutung von HLA-B27	16
3 Zielsetzung dieser Arbeit	22
4 Material	23
4.1 Nukleinsäuren	23
4.1.1 Nomenklatur der TZR.....	23
4.1.2 Plasmide und Vektoren	24
4.1.3 Oligonukleotide	25
4.1.4 Größenstandards	27
4.1.5 Übersicht der verwendeten RNS bzw. cDNS	27
4.1.6 Definition von sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten (Vorarbeiten).....	28
4.2 Bakterien.....	30
4.2.1 Bakterienstämme	30
4.2.2 Kulturmedien für Bakterienzellen	30
4.3 Eukaryotische Zellen.....	31
4.3.1 Zelllinien und Transfektanten	31
4.3.2 Kulturmedien für eukaryotische Zellen	32
4.4 Enzyme, Antikörper und Peptide.....	33
4.5 Kits und spezielle Reagenzien	34
4.6 Allgemeine Puffer und Lösungen	35
4.7 Verbrauchsmaterialien	36
4.8 Geräte	36
5 Methoden	37
5.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren	37
5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen.....	37
5.1.2 Reverse Transkription	38
5.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren und Präzipitation	38
5.1.4 Analyse von Nukleinsäuren.....	39
5.1.5 Amplifikation von DNS-Sequenzen mit PCR und RT-PCR	40
5.1.6 Klonierung von PCR-Produkten	47
5.1.7 Restriktionsverdau und Ligation	47
5.1.8 Polyacrylamidgelelektrophorese für die CDR3-Spektratypisierung.....	48

5.2	Arbeiten mit Bakterien.....	49
5.2.1	Anzucht und Konservierung von Bakterien.....	49
5.2.2	Transformation von Bakterien	50
5.2.3	Analyse von transformierten Bakterienklonen	50
5.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	51
5.3.1	Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen	51
5.3.2	Kultur von Suspensionszellen und adhärent wachsenden Zellen	51
5.3.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Elektroporation	52
5.3.4	Transfektion von Zellen mit Lipofektion	53
5.3.5	Transduktion von Zellen mit Hilfe von Retroviren	54
5.4	Funktionelle Analysen	55
5.4.1	Extrazelluläre Färbung und Durchflusszytometrie	55
5.4.2	Nachweis der Funktionalität der T-Zell-Rezeptor-Transfektanten.....	55
5.4.3	Analyse der Plasmid-kodierten Antigene nach T-Zell-Aktivierung	58
6	Ergebnisse.....	60
6.1	Identifizierung der TZR β^{ReA} -assoziierten α -Kette	60
6.1.1	Expandierte TZR α -Ketten von ReA-Patienten.....	60
6.1.2	TZR α -Ketten in Einzelzellen von ReA Patientin 006-2.5.2.1.....	74
6.2	Herstellung von Expressionsvektoren für TZR $\alpha\beta$ -Kandidaten-Ketten	76
6.2.1	Isolierung der vollen Länge cDNS der sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten	77
6.2.2	Klonierung in den Expressionsvektor RSV5hygro	79
6.2.3	Klonierung der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette in RSV5neo	80
6.3	Charakterisierung und funktionelle Analysen der TZR ReA -Kandidaten	81
6.3.1	Etablierung stabiler Transfektanten der TZR ReA -Kandidaten	81
6.3.2	Nachweis der Funktionalität der rekombinanten T-Zell-Hybridome durch TZR-Aktivierung.....	85
6.3.3	Untersuchung der allogenen TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Transfektanten auf HLA-B27- Alloreaktivität	86
6.3.4	Untersuchung der klontypischen TZR β^{ReA} -Transfektanten auf Aktivierung durch ein HLA-B27 restringiertes Selbstantigen	87
6.4	Suche nach dem arthritogenem Antigen mit TZR ReA -Kandidaten	90
6.4.1	Generierung von 58-TZR $\alpha\beta^{\text{ReA}}$ -CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten	91
6.4.2	Etablierung stabiler Transfektanten COS-B27.....	93
6.4.3	Antigensuche mit Hilfe von Plasmid-kodierten cDNS-Peptidbibliotheken	94
6.4.4	Identifizierung der Plasmid-kodierten Peptide isolierter COS-B27-Zellen durch Reaktivierung der TZR ReA -Transfektanten.....	98
6.4.5	Sequenzanalyse der identifizierten potentiellen TZR ReA -Epitope	102
7	Diskussion.....	105
7.1	Charakterisierung der TZR ReA -Kandidaten-Ketten	106
7.1.1	Identifizierung der TZR $\alpha\beta$ -Kandidaten-Ketten von ReA-Patienten.....	106
7.1.2	Rekombinante Expression der TZR ReA -Kandidaten-Ketten.....	109

7.2	Aufdeckung potentiell arthritogener Peptide anhand von TZR ^{ReA} -Kandidaten	110
7.2.1	TZR-Aktivierung nach Verwendung von Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken.....	112
7.2.2	Analyse der unterschiedlichen TZR stimulierenden Plasmide	115
7.2.3	Charakterisierung der identifizierten TZR ^{ReA} Mimotope	118
7.3	Ausblick.....	124
8	Literaturverzeichnis	126
9	Anhang.....	145
9.1	Abkürzungsverzeichnis	145
9.2	Sequenzen veröffentlichter Oligonukleotide	147
9.3	Verwendete Vektoren.....	149
9.4	VA-CA-Spektratypisierungen	152
9.5	Sequenzen der isolierten TZR α - und β -Ketten.....	153
9.6	Peptide.....	156
	Danksagung	157
	Eidesstattliche Versicherung	158

1 Zusammenfassung

Zum Formenkreis der entzündlichen Gelenkerkrankungen der Spondyloarthritis wird auch die Reaktive Arthritis (ReA) gezählt. Eine Besonderheit der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung ist die ursächliche Bedeutung einer vorausgegangenen bakteriellen Infektion. Zudem ist eine Assoziation mit dem antigenpräsentierenden Zelloberflächen-Molekül HLA-B27 bekannt und dass ins Gelenk infiltrierende, zytotoxische T-Zellen bei der Entzündungsreaktion der ReA beteiligt sind. Anhand dieser Tatsachen wurde die arthritogene Peptid-Hypothese postuliert, nach der die Entzündung aufgrund einer Antigen-erkennung durch einen kreuzreaktiven T-Zell-Rezeptor (TZR) ausgelöst wird. Ein von HLA-B27 präsentierte Autoantigen weist dabei strukturelle Ähnlichkeiten entsprechend einer molekularen Mimikry mit einem bakteriellen Fremdantigen auf. Bisher konnte jedoch kein entsprechendes Autoantigen identifiziert werden. In früheren Studien erfolgten aus isolierter Synovialflüssigkeit (SF) von ReA-Patienten Nachweise expandierter CD8⁺ T-Zellklone mit einer spezifischen β -Kette des TZRs (klontypische TZR β^{ReA} -Kette), dem dadurch eine pathogene Funktion zugeordnet wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnten fünf klonal expandierte Kandidaten der unbekanntes TZR α -Kette aus SF-T-Zellen eines ReA-Patienten identifiziert werden. Der Nachweis in T-Zellen mit der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette erfolgte mithilfe einer α -Ketten-Spektroskopie, eine Analyse der gepaarten TZR $\alpha\beta$ -Ketten in Einzelzellen dieses Patienten konnte eine dieser Kandidaten- α -Ketten bestätigen. Darüber hinaus konnte in einer von fünf weiteren analysierten SF-T-Zellpopulationen von ReA-Patienten eine TZR α^{ReA} -Kandidaten-Kette nachgewiesen werden. Die fünf verschiedenen α^{ReA} -Ketten wurden jeweils mit der klontypischen β^{ReA} -Kette rekombinant in einem TZR-defizienten T-Zell-Hybridom funktionell exprimiert. Diese potentiell pathogenen TZR α^{ReA} -Kandidaten wurden für die Suche nach einem arthritogenen Peptid herangezogen. Die Auswahl der zu testenden Antigene beruhte auf zur Verfügung stehenden HLA-B27 restringierten Peptiden. Erste Versuche mit immundominanten Epitopen blieben erfolglos. Deshalb wurde eine sensitive Methode zur unvoreingenommenen Suche nach dem erkannten Peptid mit Hilfe von Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken verwendet. Antigene verschiedener Peptidbibliotheken wurden dabei auf HLA-B27⁺ antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Eine passende Antigenerkennung offenbarte sich aufgrund einer TZR-Aktivierung der T-Zell-Hybridome durch ein grün fluoreszierendes Reporterprotein. Dies erlaubte die Isolierung der antigenpräsentierenden Zelle und somit die Identifizierung des erkannten Peptids. Vergleiche dieser Peptide mit den menschlichen und bakteriellen Proteomen ermöglichten es, mehrere potentielle arthritogene Zielantigene zu erwählen. Es wurden vier unterschiedliche T-Zell-Epitope für einen TZR α^{ReA} -Kandidaten identifiziert, die hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen starke Ähnlichkeiten mit natürlichen bakteriellen und humanen Peptiden aufweisen. Die Identifizierung der erkannten T-Zell-Epitope bei der ReA ist ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Immunpathologie.

Summary

Reactive arthritis (ReA) is a member of a group of inflammatory joint diseases of the spondyloarthropathies. In this autoimmune disorder a preceding bacterial infection is a known causative. Furthermore, a strong association with the antigen presenting cell surface molecule HLA-B27 has been widely established and cytotoxic T cells infiltrating the joint attacking autologous cells are known to be involved in the inflammation. A common hypothesis for the pathogenesis of ReA is the arthritogenic peptide model. It suggests that the immune response is triggered by cross reactive T cell receptors (TCR), which recognize an autologous antigen displaying structural similarities with a bacterial peptide, thereby constituting a molecular mimicry. To date no arthritogenic peptide has been identified. Previous studies demonstrated the expansion of CD8⁺ T cell clones in synovial fluid of inflamed joints based on the presence of a specific TCR β -chain (clonotypical TCR^{ReA} β -chain), the TCR of these cells was therefore postulated to have a pathogenic function.

In this thesis five clonally expanded candidates of the unknown α -chain were identified by spectratyping in synovial T cells with the clonotypical TCR^{ReA} β -chain of a ReA patient. The analysis of paired TCR $\alpha\beta$ -chains in single cells confirmed one of these candidates. A TCR^{ReA} α -candidate-chain was corroborated in one of five analyzed synovial T cell populations from ReA patients. The recombinant functional expression of the five potentially pathogenic TCR^{ReA} α -chains combined with the clonotypical β ^{ReA}-chain in a TCR-deficient T cell hybridoma enabled the search for the arthritogenic peptide. A selection of known HLA-B27 presented peptides was not recognized by these TCRs. Therefore, a sensitive method for an unbiased search with plasmid-encoded combinatorial peptide libraries was chosen. Antigens from different peptide libraries were expressed in HLA-B27⁺ antigen presenting cells. Antigen recognition was detected upon expression of a green fluorescent reporter protein resulting from TCR activation of the individual T cell hybridomas. Thereby, the targeted antigen-presenting cell could be isolated and the stimulating peptide identified. Comparisons of these peptides with human and bacterial proteoms facilitated the selection of several potential arthritogenic TCR target antigens. Four different T cell epitopes for one TCR^{ReA} candidate were identified. Their amino acid sequences display strong similarities to natural bacterial or human peptides. The identification of cross-reactive T cell epitopes involved in ReA is an important step towards the elucidation of the molecular basis for this immunopathology.

2 Einleitung

Die starke Assoziation des Transplantationsantigens HLA-B27 mit bestimmten Autoimmunerkrankungen ist schon lange bekannt, jedoch sind die genauen Pathomechanismen noch nicht hinreichend aufgeklärt. Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stehen die beteiligten Faktoren einer genetischen Disposition und eines gestörten Immunsystems bei der Pathogenese der autoimmunen Erkrankung der Reaktiven Arthritis (ReA). Der theoretische Hintergrund der Einleitung umfasst deshalb einen generellen Überblick des Immunsystems sowie eine ausführlichere Schilderung der daran beteiligten MHC-Moleküle, T-Zellen und deren Interaktion sowie die bisherigen Erkenntnisse der Assoziation.

2.1 Das menschliche Immunsystem

Den menschlichen Körper vor lebensbedrohlichen Infektionen zu bewahren und eindringende Pathogene sowie krankhaft veränderte Zellen zu eliminieren, wird durch die komplexe Zusammenarbeit des Immunsystems sichergestellt. Seine außergewöhnliche Spezifität und Diversität ermöglicht es zwischen körpereigenen und –fremden Zellen zu unterscheiden. Dabei schützt es den Organismus vor Krankheitserregern, wie Pilze, Parasiten, Bakterien oder Viren, kann zudem entartete Zellen erkennen und beseitigen ohne aber körpereigene Strukturen anzugreifen.

Das Immunsystem wird unterteilt in die natürlichen oder angeborenen und adaptiven oder erworbenen Abwehrmechanismen. Die evolutionär ältere, angeborene Immunabwehr ist relativ antigenunspezifisch, allerdings auch schnell verfügbar und weitläufig einsetzbar. Zu ihr gehören sowohl die Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), als auch das Komplementsystem, das durch die Opsonisierung von Pathogenen zur Lyse der komplementbeladenen Zelle führt. Eine natürliche Immunantwort ist in allen Individuen zu jeder Zeit gegeben, verstärkt sich weder nach mehrmaligem Kontakt mit einem Erreger noch unterscheidet sie zwischen verschiedenen Erregern.

Das gezielte, spezifische Vorgehen gegen ein fremdes Antigen und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses werden dagegen über das adaptive Immunsystem vermittelt. Es besteht aus einer humoralen und einer zellulären Immunantwort. Die Produktion von Antikörpern (AK) bzw. Immunglobulinen durch B-Zellen nach Antigenkontakt und ihre Sezernierung stellt die humorale Immunantwort dar. Antikörper können an lösliche Antigene binden zur Neutralisation z.B. von Toxinen oder an Antigene auf der Zelloberfläche von Pathogenen oder infizierten Zellen zur Markierung für eine Eliminierung durch Makrophagen oder NK-Zellen. Dem gegenüber steht die zelluläre Immunantwort, die vor allem mittels T-Lymphozyten intrazelluläre Pathogene bekämpft. Die Erkennung des Antigens erfolgt hier über einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR). Im Gegensatz zu den Antikörpern der B-Lymphozyten können die Rezeptoren der T-Zellen kein natives Antigen erkennen. Antigene werden deshalb in Peptide gespalten und über membrangebundene Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (Major Histocompatibility Complex, kurz MHC) präsentiert.

Die mit Peptiden beladenen MHC-Moleküle (pMHC) auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aktivieren T-Zellen, die daraufhin Zytokine sezernieren oder infizierte Zellen lysieren bzw. in diesen Apoptose auslösen können. Ein bestimmtes Antigen bedingt somit eine gezielte und spezifische Immunreaktion, welche durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses bei einer erneuten Infektion in einer schnelleren und effektiveren Immunreaktion resultiert.

2.2 MHC-Moleküle

Die MHC-Zelloberflächenmoleküle sind ursprünglich als Faktoren der Transplantatabstoßung entdeckt worden (Gorer, 1938) und ermöglichen mittels Antigenpräsentation die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst. Eine große Bedeutung spielen sie bei der Entwicklung von T-Zellen, Antigenerkennung durch T-Zellen, Abstoßung von Transplantaten und Anfälligkeit für viele immunologische Erkrankungen. T-Lymphozyten sind zur Antigenerkennung nur in der Lage, wenn ihnen Peptide des Antigens durch ein Selbst-MHC-Molekül präsentiert werden, was als MHC-Restriktion bezeichnet wird (Zinkernagel und Doherty, 1974).

Die Einteilung von MHC-Molekülen in die Klassen I und II erfolgt nach den unterschiedlichen Strukturen und Expressionsmustern und reflektiert die Herkunft der präsentierten Peptide und die daraus resultierende interagierende T-Zellpopulation.

MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II) findet man auf Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten. Sie präsentieren extrazelluläre, z.B. bakterielle Antigene. Diese werden durch Phagozytose oder Endozytose von der Zelle aufgenommen, in Endosomen abgebaut und abgeleitete Peptide auf MHC-II-Moleküle geladen. MHC-II exprimierende Zellen interagieren mit T-Helferzellen (Babbitt et al., 1985). Diese tragen CD4 als Korezeptor für MHC-II-Moleküle und helfen als T_H2 -Zellen durch die Produktion von Zytokinen den Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene oder aktivieren als T_H1 -Zellen Makrophagen bzw. $CD8^+$ T-Zellen.

Im Gegensatz dazu werden die MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I) konstitutiv auf allen kernhaltigen somatischen Zellen in unterschiedlicher Quantität exprimiert. Sie präsentieren Peptide von intrazellulären Proteinen, die den zytoplasmatischen Prozessierungsweg durchlaufen haben (Germain, 1994). Dabei werden die zytosolischen Proteine im Proteasom in Peptide aufgespaltet und dringen durch den ATP-abhängigen TAP-Transporter (transporter associated with antigen processing) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ein (Hansen und Bouvier, 2009). Dort werden die Peptide auf neu synthetisierte MHC-I-Moleküle geladen, verlassen nach vollständiger und korrekter Faltung das ER und erreichen über den Golgi-Apparat durch einen selektiven Transportmechanismus die Zelloberfläche (Townsend et al., 1990; Pamer und Cresswell, 1998). Das pMHC-I wird von zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL), die als Korezeptor CD8 tragen, erkannt. Zellen, die Peptide intrazellulärer Pathogene auf MHC-I-Moleküle präsentieren, werden als infiziert identifiziert und durch zytotoxische Reaktionen getötet. Die $CD8^+$ T-Zelle lysiert mittels Effektorproteinen, wie Perforin und Granzym, die Zielzelle oder löst bei ihr

Apoptose über die Bindung ihres Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor aus (Harty und Badovinac, 2002; Medana et al., 2000). MHC-I-Moleküle enthüllen somit, ob körpereigene Zellen physiologisch intakt oder infiziert sind und durch das spezifische Repertoire der TZR werden Zellen mit viralen, bakteriellen, parasitären oder tumorassoziierten Antigenen selektiv abgetötet. Eine weitere wichtige Funktion von pMHC-I ist die Regulation der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen. Diese sind darauf spezialisiert infizierte Zellen, die eine verminderte MHC-I-Zelloberflächenexpression aufweisen, zu töten.

Die menschlichen MHC-Moleküle werden im HLA-Komplex (human leukocyte antigen bzw. humanes leukozytenassoziiertes Antigen) kodiert. Um die hohe Diversität zu erreichen, die benötigt wird vielfältige Erreger zu erkennen, sind die HLA-Gene der Klasse I und II polygen und polymorph. Der HLA-Komplex liegt auf Chromosom 6 (6p21.3), erstreckt sich über ca. 3,5 Mb und enthält 128 Gene sowie 96 Pseudogene. Von zentromer nach telomer wird der HLA-Komplex historisch bedingt in die Klasse-II-, Klasse-III- und Klasse-I-Region unterteilt. Die HLA-Klasse-II-Region enthält Gene, die für die α - und β -Ketten der HLA-Klasse-II-Moleküle kodieren sowie Gene des Antigenpräsentationsweges. Die Gene für die α -Kette der klassischen, polymorphen HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Moleküle und der nicht-klassischen HLA-E-, HLA-F- und HLA-G-Moleküle definieren die HLA-Klasse-I-Region. Aufgrund des geringen Polymorphismus, der beschränkten Gewebeverteilung, der geringen Expression und der bis dahin unbekannt Funktion wurden HLA-E, -F und -G als nicht-klassische Klasse-I-Moleküle bezeichnet (Le Bouteiller und Lenfant, 1996). Das β_2 -Mikroglobulin, das für die essentielle Untereinheit des HLA-Klasse-I-Moleküls kodiert, liegt auf Chromosom 15 (15q21). Die Klasse-III-Region enthält unter anderem Gene für Komplementproteine, Zytokine und Hitzeschockproteine. Da die Expression der HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Gene kodominant ist, kann jeder Mensch bis zu sechs verschiedene HLA-I-Moleküle und ebenfalls bis zu sechs unterschiedliche HLA-II-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. Die drei klassischen HLA-I-Loci sind hochpolymorph, wobei die Unterschiede in den Peptidbindungsregionen der einzelnen Allele liegen. Die hohe Zahl an Allelen in einer Population stellt sicher, dass ein Pathogen zumindest von einem Teil der Bevölkerung erkannt wird. Dieser Polymorphismus ist auch die Grundlage für die Erkennung von Fremdgewebe bei Transplantationen.

HLA-I-Moleküle sind membranständig und gehören zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Die Struktur des HLA-I-Moleküls setzt sich aus einer schweren glykosylierten α -Kette (43 - 45 kDa), die in drei extrazelluläre Domänen unterteilt ist, und einem nicht-kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin (β_2 M; 12 kDa) zusammen (siehe eine schematische Darstellung im oberen Teil der Abbildung 1, S. 7). Das β_2 M spielt eine Rolle bei der Faltung des Moleküls sowie beim intrazellulären Transport, da es für die Konformationsstabilität des Gesamtmoleküls sorgt. Alle drei Domänen der HLA-I schweren Kette haben mit β_2 M Kontakt (Tysoe-Calnon et al., 1991). Die beiden aminoterminalen Domänen α_1 und α_2 bilden zusammen die Peptidbindungsgrube. Sie besteht aus einem Boden aus acht β -Faltblättern, stabilisiert durch zwei randbildende α -Helices, so dass Peptide mit bestimmten Sequenzmerkmalen gebunden werden können (Hülsmeier et al., 2002). Die HLA-I-Bindungsgrube ist an beiden Enden geschlossen, wodurch die bindenden Peptide auf eine Länge von 8 - 11 Aminosäuren limitiert werden. Den von einem HLA-I-Allel gebundenen Peptiden gemeinsam sind zwei bis drei Aminosäuren, so genannte Ankerpunkte, über die die Peptide mit Aminosäureseiten-

ketten des jeweiligen HLA-I-Moleküls in Wechselwirkung treten (Matsumura et al., 1992). Die größte Variabilität zwischen den einzelnen Klasse-I-Molekülen findet man in diesen Aminosäuresequenzen. Die unterschiedlichen HLA-Allele bestimmen auf diese Weise das präsentierte Peptidrepertoire. Auf die Peptidbindungsregion folgt noch extrazellulär die Ig-ähnliche α_3 -Domäne. Sie ist konserviert, da sie die Bindungsstelle für den CD8-Korezeptor und auch die Hauptbindungsstelle für β_2M enthält (Bjorkman et al., 1987; Salter et al., 1990).

2.3 Der T-Zell-Rezeptor (TZR)

Auf der Zelloberfläche exprimiert eine T-Zelle ca. 30 000 identische T-Zell-Rezeptoren (TZR). Diese Rezeptoren setzen sich bei einer Mehrzahl der peripheren T-Zellen aus einem Heterodimer von α - und β -Ketten zusammen (Meuer et al., 1983). Die übrigen etwa 5-10 % T-Zellen weisen einen $\gamma\delta$ -TZR auf (Brenner et al., 1986), dessen genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist.

Anhand der Struktur der Polypeptidketten werden die TZR zur Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet. Im Mittelpunkt der Arbeit steht der $\alpha\beta$ -TZR auf $CD8^+$ T-Zellen. Daher werden im Folgenden dessen Aufbau mit Signalweiterleitung in das Zellinnere, die Entstehung seiner Rezeptordiversität sowie die Aktivierung der T-Zellen durch pMHC-I-Molekülen erläutert.

Aufbau des TZR-Komplexes und Signalweiterleitung

Von MHC-Molekülen präsentierte Antigene werden vom TZR über die variablen Anteile der TZR α -Kette (43 - 49 kDa) und TZR β -Kette (38 - 44 kDa) erkannt. Jede Kette setzt sich aus einem extrazellulären Bereich, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt zusammen. Eine Disulfidbrücke verbindet beide Ketten extrazellulär nahe der Zellmembran. Die Struktur des TZR in Kontakt mit pMHC-I und ein Teil der Signalweiterleitung ist in Abbildung 1 der folgenden Seite schematisch dargestellt.

Sowohl die TZR α - als auch die TZR β -Kette wird aus einer variablen Region (V α bzw. V β) von ca. 130 Aminosäuren und einer konstanten Region (C α bzw. C β) von etwa 174 - 176 Aminosäuren gebildet. Die konstanten Regionen sind in sämtlichen TZR gleich. Dagegen kodieren mehrere Gensegmente die variablen Abschnitte und sind für jeden TZR spezifisch, damit der Körper auf eine Vielzahl an unterschiedlichen Antigenen mit einer entsprechenden T-Zell-Antwort reagieren kann. Die Antigenerkennung aktiviert die T-Zelle und löst eine starke Proliferation aus. Die Analyse der erhöhten antigenspezifischen Zellen mit klonotypischen TZR innerhalb der gesamten T-Zellpopulation kann deshalb Auskunft über Existenz und Eigenschaft zurückliegender Antigenkontakte liefern.

Das TZR- $\alpha\beta$ -Heterodimer erkennt seinen pMHC-Partner, kann jedoch durch seinen kurzen zytoplasmatischen Teil keine Signale ins Zellinnere weitergeben. Im funktionellen TZR-Komplex ist der TZR mit sechs weiteren, akzessorischen Polypeptidketten assoziiert. Diese Untereinheiten sind in Form von zwei Heterodimeren (CD3 ϵ - δ , CD3 ϵ - γ) angeordnet und bilden den CD3-Komplex (Clevers et al., 1988; Call et al., 2002). Daneben existiert ein Homodimer zweier ζ -Ketten, die weit ins Zytoplasma reichen.

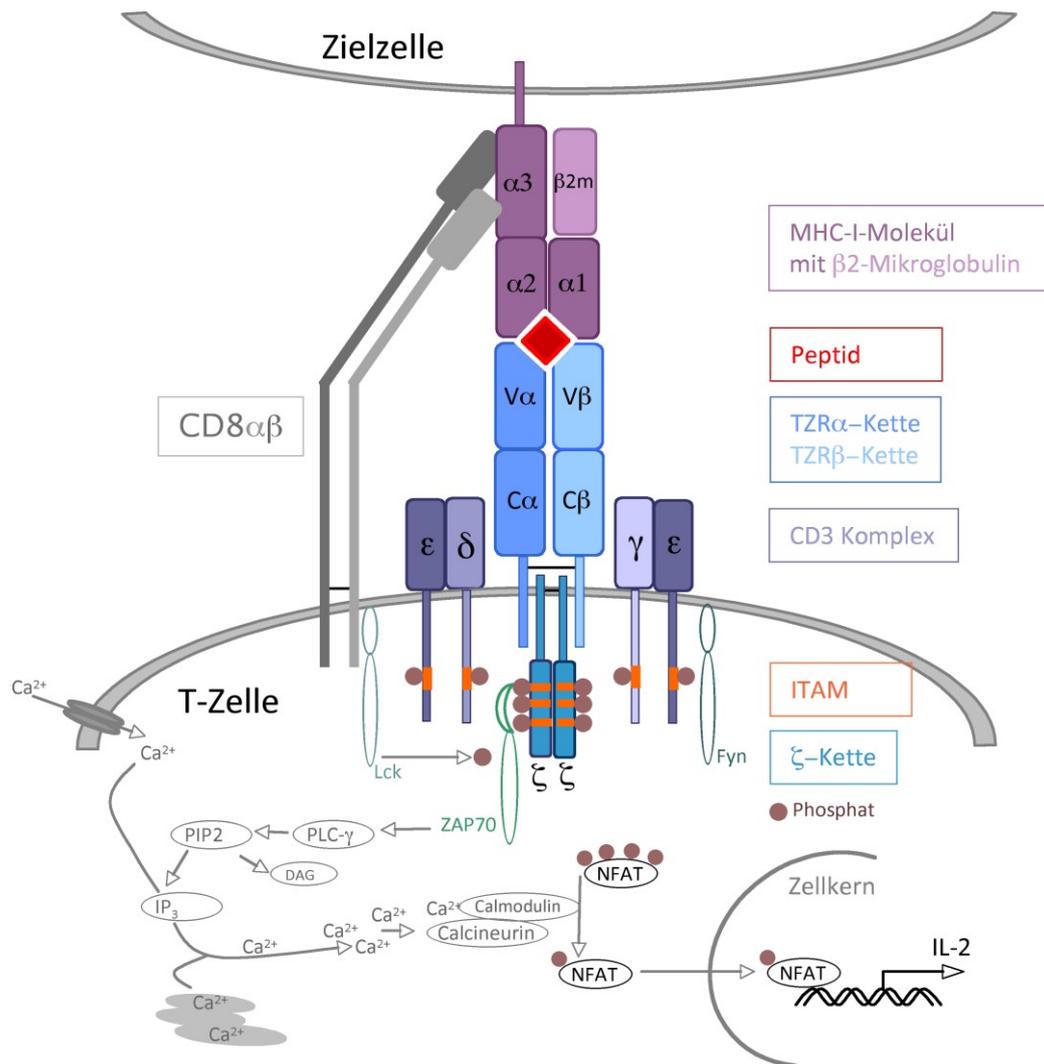


Abbildung 1: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes mit Bindung an pMHC-I und intrazelluläre Signalweiterleitung des NFAT-Aktivierungswegs

Der T-Zell-Rezeptor (TZR) auf der T-Zelle setzt sich jeweils aus den konstanten Bereichen $C\alpha/C\beta$ und den variablen Bereichen $V\alpha/V\beta$ einer α - und einer β -Kette zusammen und ist mit dem CD3-Komplex assoziiert. Dieser besteht aus Heterodimeren (ϵ - δ bzw. ϵ - γ) und dient der Stabilisation und, wie das Homodimer der beiden ζ -Ketten, der Signalweiterleitung ins Zellinnere. Ein pMHC-I in Kontakt mit dem TZR befindet sich im oberen Teil auf der Zielzelle. Die α -Kette setzt sich aus den extrazellulären Domänen α_1 , α_2 und α_3 zusammen, die mit dem β_2 Mikroglobulin (β_2m) assoziiert sind. Die α_1 - und α_2 -Domäne von MHC-I bilden die Peptidbindungsgrube, in der das präsentierte Peptid (rot) verankert ist. Der CD8-Korezeptor der T-Zelle besteht aus einem $\alpha\beta$ -Heterodimer (kann auch als $\alpha\alpha$ -Homodimer vorliegen) und bindet an die α_3 -Domäne des pMHC-I-Moleküls. Durch die Tyrosinphosphorylierung in den orange markierten ITAM-Bereichen nach Aktivierung des TZR wird eine Signalweiterleitungskaskade in Gang gesetzt, an deren Ende Transkriptionsfaktoren wie NFAT aktiviert werden, die spezifische Genexpressionen wie IL-2 induzieren, die zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führt. Nur ausgewählte relevante Moleküle der intrazellulären Weiterleitung zur Aktivierung von NFAT sind als Beispiel dargestellt, deren Abkürzungen im Text näher erläutert werden.

Der CD3-Komplex ist für die korrekte Zusammenlagerung und Oberflächenexpression des TZR und für die Signalübermittlung ins Zellinnere erforderlich (Samelson et al., 1986; Saito et al., 1987). Wichtig dafür sind besondere Aminosäuresequenzen, so genannte ITAM

(immunoreceptor tyrosine based activation motif), von denen sich je eine an den CD3-Ketten und je drei an den ζ -Ketten befinden. Die Tyrosinreste dieser ITAM können durch Tyrosinkinasen phosphoryliert werden (Smith-Garvin et al., 2009). So lösen sie eine Signaltransduktionskaskade aus, an deren Ende die Transkriptionsaktivierung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren im Kern wie im hier erläuterten ausgewählten Beispiel von NFAT (nuclear factor of activated T cells) steht (Müller und Rao, 2010).

Auch das Korezeptormolekül CD8 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen und moduliert die effektive Antigenerkennung. Es bindet an die α_3 -Domäne von pMHC-I, bewirkt eine Zusammenlagerung von TZR und Korezeptoren, erhöht die Sensitivität des TZR für das Antigen über das Hundertfache und ist an der Rekrutierung von Tyrosinkinasen zur Signalweiterleitung beteiligt.

Nach Bindung des TZR an pMHC-I-Liganden bindet die Tyrosinkinase Lck an den zytoplasmatischen Teil von CD8 α und zusammen mit anderen Rezeptor-assoziierten Kinasen wie Fyn führen sie zur Phosphorylierung der ITAM der CD3-Ketten und der ζ -Ketten. ZAP-70 (ζ -Ketten-assoziiertes-Protein) bindet an die phosphorylierten ITAM der ζ -Ketten und wird zusätzlich durch die Kinase Lck aktiviert, was in weiteren Schritten schließlich zur Aktivierung von Phospholipase C- γ (PLC- γ) führt, die Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ öffnet Kalziumkanäle im ER und damit die Öffnung von Kanälen an der Plasmamembran zum Einstrom von extrazellulären Kalziumionen. Die erhöhte Kalziumkonzentration im Zytoplasma aktiviert die Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin. Zytoplasmatisch inaktives NFAT wird daraufhin durch Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert in den Zellkern transportiert. Dort induziert der Transkriptionsfaktor die Genexpression spezifischer Gene wie das Gen für das Zytokin Interleukin-2 (IL-2). Sezerniertes IL-2 bindet an hochaffine IL-2-Rezeptoren und fördert auf autokrine und parakrine Weise das T-Zell-Wachstum und Differenzierung mit spezifischen Effektorfunktionen. Die Messung der IL-2-Produktion kann eine Aktivierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen nachweisen. Ebenfalls kann dies durch einen NFAT-abhängigen Promotor erfolgen, der die Transkription von Reportergenen, wie z.B. die β -Galaktosidase, induziert (Karttunen und Shastri, 1991).

Generierung der Rezeptordiversität bei T-Zellen

Die Gene des TZR sind, neben denen der Immunglobulingene, die einzigen bekannten Gene der Vertebraten, die nicht keimbahnkodiert sind, sondern werden erst während der Entwicklung der T-Lymphozyten durch somatische Rekombination von mehreren Gensegmenten generiert.

Der Genlocus für die α -Kette des TZR (TRA-Gene) liegt beim Menschen auf Chromosom 14q11, der Genlocus für die β -Kette des TZR (TRB-Gene) auf Chromosom 7q34. Zwischen den Gensegmenten liegen Bereiche, in denen sich Signalsequenzen zur Rekombination befinden (Wilson et al., 1988). Der TRA-Genlocus kodiert 54 TRAV-Gensegmente (VA; variable), 61 TRAJ-Gensegmenten (JA; joining) und ein TRAC-Gensegment (CA, constant). Das TRAC-Gen enthält getrennte Exons für die konstante und die Gelenkregion sowie ein einziges Exon für die Transmembran- und Zytoplasmaregionen. 44 - 46 TRAV-Gensegmente sind funktionell und sind in 34 VA-Subgruppen eingeteilt. Zwischen den TRAV- und den TRAJ-Segmenten liegen die TRD-Segmente, die für die δ -Kette des $\gamma\delta$ -TZR kodieren. Der Genort für die γ -Kette ist auf Chromosom 7p15.

In der TRB-Region folgen auf die 64 - 67 TRBV-Gensegmente (40 - 48 davon sind funktionelle Gene, die in 21 - 23 VB-Subgruppen unterteilt werden) zwei Gensegmentgruppen, die jeweils ein TRBD (DB1 bzw. DB2; diversity), 6 bzw. 7 TRBJ (JB1.1-JB1.6 bzw. JB2.1-JB2.7) und je ein TRBC (CB1 bzw. CB2) enthalten. Jedes TRBC-Gen besteht aus vier Exons, die für die konstante Domäne, die Gelenk-Region, die Transmembranregion und die zytosmatische Region kodieren (Arden et al., 1995; Rowen et al., 1996, Lefranc und Lefranc, 2001; Gensegmente und Sequenzen IMGT Datenbank <http://www.imgt.org>).

Die Gensegmente werden im Laufe der T-Zell-Reifung im Thymus irreversibel miteinander verknüpft um eine funktionelle α - bzw. β -Kette des TZR zu kodieren. Erst nach erfolgreicher Rekombination der TRB-Gensegmente auf einem der beiden homologen Chromosomen werden die TRA-Gene rearrangiert. Bei der Umlagerung der β -Kette wird zunächst ein D- mit einem der J-Gensegmente verknüpft und anschließend ein V-Gensegment mit dem D-J-Rekombinationsprodukt (Ferradini et al., 1991). Danach wird am TRA-Genlokus ein V- mit einem J-Gensegment rekombiniert (Alt et al., 1992; Gellert, 1992). Welche Gensegmente miteinander verknüpft werden, ist dem Zufall überlassen. Allerdings wird durch die Deletion der dazwischen liegenden Elemente ein erneutes Rearrangement eingeschränkt. Jedes AV- bzw. BV-Element besteht aus zwei Exons, wovon das erste jeweils das Signalpeptid (L=Leader) kodiert. Nach der Rekombination wird durch Transkription und Spleißen die mRNS von LV(D)JC gebildet, die zum Protein der α - bzw. β -Ketten des TZR translatiert wird. Die Abbildung 2 zeigt schematisch die V(D)J-Rekombination des TRA- und des TRB-Genlokus.

Für diese Umlagerung sind stark konservierte Rekombinationssignalsequenzen (RSS) verantwortlich, welche die einzelnen Gensegmente flankieren. Diese bestehen aus einer definierten Längenabfolge einer Heptamer-Spacer-Nonamersequenz, wobei der Abstandhalter 12 bzw. 23 bp lang ist. Die Heptamersequenz liegt immer proximal zum Gensegment. Ein Segment mit einem 12 bp langen Abstandhalter kann nur mit einem Gensegment rekombinieren, welches einen 23 bp langen Abstandhalter trägt (12/23-Regel). Ein Komplex aus Enzymen, u.a. RAG1 und RAG2 (recombination activating genes) erkennt diese Signalsequenzen (Schatz et al., 1992) und initiiert die Bildung eines DNS-Doppelstrangbruches am Ende der Heptamersequenz. Bei dieser Verknüpfung der einzelnen Elemente kommt es mit Hilfe des Enzyms TdT (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) zur Insertion von P- (palindrome) oder N-Nukleotiden (non germline bases) oder durch noch unbekannte Exonukleasen zur Deletion. Dadurch kommt es zu einer Längenvariabilität von 15 - 45 Nukleotiden auf DNS- und mRNS-Ebene (Moss und Bell, 1995), die die Rezeptordiversität noch erhöht.

Innerhalb der beiden Ketten des Rezeptors konnten mit Hilfe von Sequenzvergleichen drei hypervariable Bereiche ermittelt werden, die man als komplementaritätsbestimmende Regionen CDR1, CDR2, CDR3 (complementarity determining region) bezeichnet (siehe Abbildung 2) (Jores et al., 1990; Katayama et al., 1995). Genau die Domänen interagieren bei der Antigenerkennung mit dem pMHC-Liganden (Chothia et al., 1988).

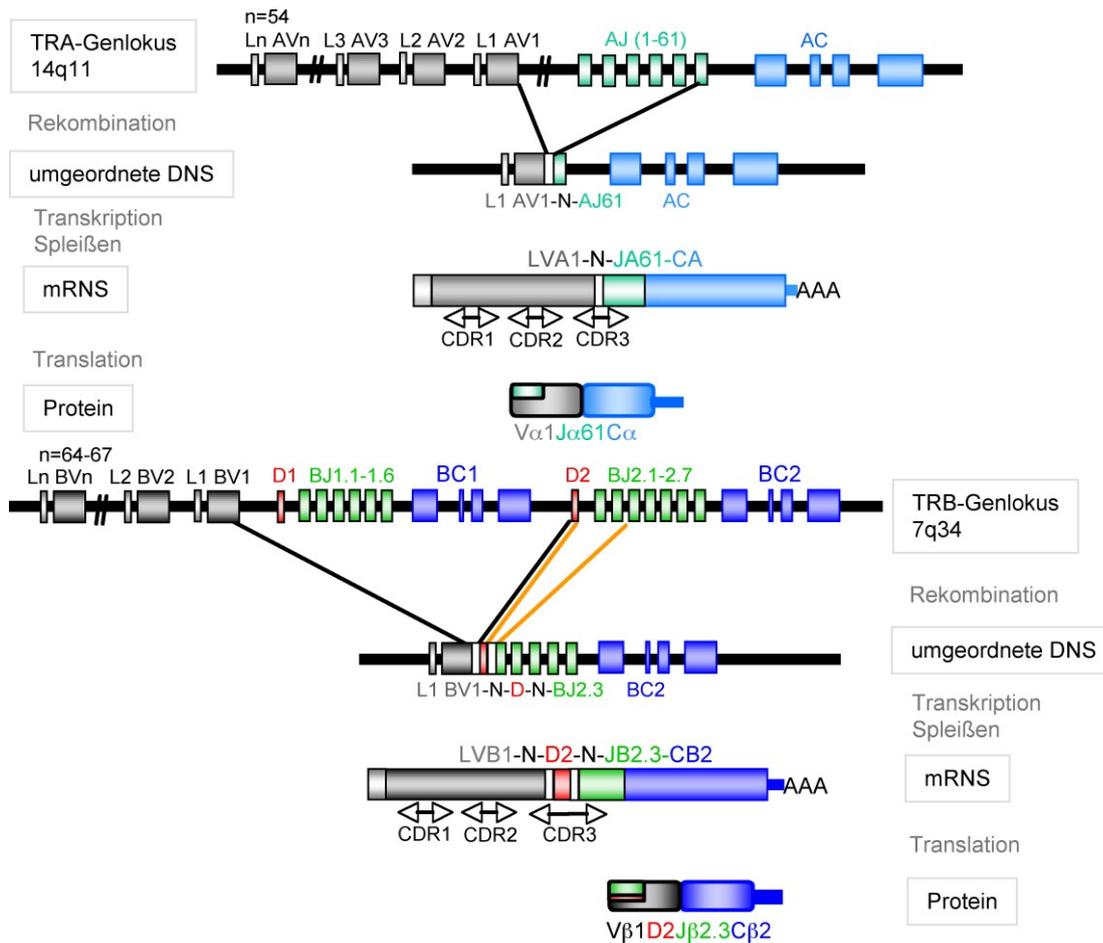


Abbildung 2: Rekombination und Expression der Gene für die α- und β-Kette des TZR

Bei der somatischen Rekombination werden aus den verschiedenen V-, (D-), J-Keimbahn-Segmenten je eines ausgewählt und miteinander verknüpft. Vor jedem AV bzw. BV-Gensegment befindet sich ein Exon L (Leader), das für das Signalpeptid kodiert. Bei der α-Kette wird ein AV-Gensegment mit einem AJ-Gensegment verknüpft, so dass ein funktionelles Exon für die variable Region entsteht. Bei der β-Kette wird das Exon für den variablen Bereich von drei Gensegmenten BV, D, und BJ kodiert und die Umlagerung erfolgt in zwei Schritten. Die erste Umlagerung des D-Segments mit einem BJ-Segment wird durch die orangenen Striche gezeigt. Beim zweiten Schritt wird ein BV-Element zu dem DBJ-Element verknüpft (schwarz). Die Rezeptordiversität wird durch Addition oder Deletion von N-Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen der Segmente beider Ketten erhöht.

Die mRNS der umgelagerten Gene werden in α- und β-Polypeptide translatiert und in Form des TZR in Zusammenhang mit dem CD3-Komplex (nicht dargestellt, siehe Abbildung 1) auf der Zelloberfläche exprimiert. Die mRNS ist vergrößert dargestellt und es sind die Kodierungsstellen der CDR-Regionen markiert (aus Schönwetter-Steer, 2005).

Nach der TZR-Umlagerung gibt es im Gegensatz zu den Immunglobulinen jedoch keine somatische Hypermutation, so dass die Variabilität der CDR1- und CDR2-Regionen auf die der Keimbahn-V-Segmente beschränkt bleibt. Diese Regionen sind vorwiegend in der Interaktion mit den α-Helices des MHC-Moleküls involviert (Davis et al., 1998). Eine höhere Variabilität weist hingegen die CDR3-Region auf, weil sie den Bereich der V-(D)-J-Verknüpfungsstellen mit möglichen N-Nukleotidsubstitutionen umfasst. Deshalb tritt diese Domäne direkt in Kontakt mit dem präsentierten Antigenpeptid. Wichtige Hinweise auf die

Struktur des erkannten Epitops kann man deshalb durch Analysen der Aminosäuresequenzen bzw. der mRNS-Sequenzen der CDR3-Regionen erlangen.

Die theoretisch mögliche Diversität des TZR steigt aufgrund aller dargestellten Kombinationen auf insgesamt 10^{15} . Was eine optimale Voraussetzung zur Erkennung aller möglichen Antigene bietet (Davis und Bjorkman, 1988). In vivo Experimente zeigten jedoch, dass sich in der Peripherie etwa eine Gesamtanzahl an 10^{12} T-Zellen findet (Arstila et al., 1999). Die TZR-Diversität wird von vielen Faktoren, wie z.B. der Selektion im Thymus oder der MHC-Peptid-Interaktion beeinflusst. Deshalb wird die effektive TZR-Diversität naiver T-Zellen auf 2×10^7 geschätzt (Nikolich-Zugich et al., 2004).

Differenzierung und Selektion des TZR im Thymus

Die hohe Variabilität der TZR gewährleistet eine Reaktion auf verschiedenste Antigene. Das birgt jedoch auch die Gefahr, dass autoreaktive TZR entstehen können. Um dem zu entgehen werden die T-Zellen im Thymus einem Selektionsprozess unterzogen. Im Knochenmark entstehen die Vorläufer der T-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen, die in den Thymus einwandern (T- für Thymus-abhängige Zellen) und dort als Thymozyten zu T-Zellen mit funktionellen TZR sowie entsprechenden Korezeptoren heranreifen, die sowohl auf Selbst-MHC-Restriktion als auch auf Selbsttoleranz selektioniert werden (Huseby et al., 2005; Morris und Allen, 2012). Dabei ereignet sich zuerst die somatische Rekombination der β -Kette des TZR. Wenn das Gen produktiv umgelagert wurde und als Prä-T-Zell-Rezeptor exprimiert wird, kommt es zu einer allelischen Exklusion und der zweite β -Genlokus auf dem homologen Chromosom kann nicht mehr rearrangiert werden. Bei der Rekombination des α -Ketten-Genlokus findet jedoch kein Allelauschluss statt und die Gene für die α -Kette können sowohl auf beiden Chromosomen als auch mehrmals hintereinander umgeordnet werden. Deshalb kann es zu T-Zellen kommen, auf deren Oberfläche zwei verschiedene α -Ketten mit der gleichen β -Kette exprimiert werden. Der Anteil dieser T-Zellen mit dualen TZR wird auf bis zu 30 % der peripheren T-Zellen geschätzt (Padovan et al., 1993). Studien deuten darauf hin, dass ein Großteil dieser T-Zellen funktionslose TZR exprimieren und etwa 5 % von ihnen stark auf Antigene reagieren (Kekäläinen et al., 2010).

Nach erfolgreicher TZR-Umlagerung kommt es zu einer positiven Selektion der T-Zellen, wobei nur Zellen überleben, deren TZR körpereigene pMHC-Moleküle erkennt. Wenn jedoch der unreife Thymozyt im Thymus stark auf präsentierte Autoantigene reagiert, wird er durch Apoptose eliminiert. Die klonale Deletion von potentiell autoreaktiven T-Zellen wird als negative Selektion bezeichnet. Nur etwa 5 % der reifenden T-Zellen, die demzufolge eine zentrale Toleranz durchlaufen haben, verlassen den Thymus und gelangen in den peripheren Blutkreislauf.

Aktivierung von T-Zellen durch TZR-pMHC-Interaktion

Reife naive T-Zellen zirkulieren in der Peripherie ständig durch lymphatische Organe auf der Suche nach ihrem spezifischen Fremdantigen. Eine Immunantwort wird erst dann ausgelöst, wenn der TZR mit dem passenden pMHC auf einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) interagiert. Es kommt zu einer Aktivierung der T-Zelle, sie proliferiert und differenziert infolgedessen zur T-Effektorzelle und reagiert entsprechend auf die infizierte Zelle. Effektorzellen erreichen dadurch auch nicht-lymphatische Organe, da sie veränderte Ober-

flächenrezeptoren wie Adhäsionsmoleküle oder Chemokinrezeptoren tragen, und gelangen direkt an Entzündungsherde.

Der Komplex aus MHC-Molekül, Peptid und TZR wurde durch Röntgenstrukturanalysen untersucht. Die Studien zeigten, dass das TZR-Heterodimer eine zum pMHC-Molekül diagonale Anordnung besitzt (Garboczi et al., 1996, Garcia et al., 1996). Die Abbildung 1 stellt auch schematisch die Bindung des TZR an pMHC-I dar. Hauptsächlich haben dabei, wie bereits erwähnt, die CDR1 und CDR2-Regionen des TZR Kontakt mit den α -Helices des MHC-Moleküls und die CDR3-Region interagiert primär mit dem gebundenen Peptid (zusammengefasst in Rudolph et al., 2006). Bei einem immundominanten TZR wurden zusätzlich auch Aminosäuren der CDR1- und CDR2-Regionen der TZR β -Kette offenbart, die an der spezifischen Erkennung eines Influenza-Peptids im Kontext eines HLA-A2-Moleküls beteiligt sind (Ishizuka et al., 2008). Die initiale Assoziation erfolgt über die MHC-Bindung an den TZR, wohingegen der darauf folgende Peptidkontakt vor allem die Dauer der Bindung bewirkt und zur Spezifität und Stabilisation des Komplexes beiträgt (Wu et al., 2002).

Die Affinität der Interaktion des TZR mit pMHC ist sehr niedrig (Davis et al., 1998). Verglichen mit früheren Messungen von TZR-pMHC-Komplexen konnte jedoch in neueren Arbeiten eine stärkere kinetische Interaktion und eine höhere Affinität innerhalb der Ausbildung einer immunologischen Synapse in situ festgestellt werden (Huppa et al., 2010). Die TZR-Erkennung ist dessen ungeachtet äußerst sensitiv und T-Zellen können durch wenige pMHC-Moleküle (ca. 100 mit spezifischem Antigen) aktiviert werden (Valitutti et al., 1995). Es wird sogar postuliert, dass eine einzelne pMHC-Struktur dafür ausreichend ist (Sykulev et al., 1996).

Für ein bestimmtes Antigen ist die TZR-Bindung einerseits hochspezifisch, andererseits reagiert der TZR auf andere Peptidsequenzen mit geringer Spezifität, was sich mit der Degeneration des TZR erklären lässt. Ein singulärer TZR kann sogar bis zu einer Million verschiedene Peptide erkennen (Wooldridge et al., 2012). Diese kreuzreaktiven TZR kommen vor, wenn nur wenige Aminosäuren in der Peptidsequenz erkannt werden oder Kontakt haben und die anderen Positionen unterschiedlich besetzt sind. Außerdem ist die CDR3-Region bis zu einem gewissen Grad flexibel, so dass sich der TZR an ungleiche Antigene anpasst (Reiser et al., 2003). Die Antigene sind sich dabei oft strukturell ähnlich (Archbold et al., 2006).

Im Weiteren können TZR auch Fremd-MHC-Moleküle erkennen, was als Alloreaktivität bezeichnet wird und sowohl Peptid-abhängig als auch -unabhängig auftreten kann. Schätzungen zufolge ist 1 - 10 % der T-Zellen alloreaktiv. Ein TZR kann unabhängig von strukturellen Ähnlichkeiten ferner durch multiple pMHC-Moleküle aktiviert werden und dementsprechend weist jeder TZR grundsätzlich Polyspezifität auf (Felix et al., 2007).

Zur vollständigen T-Zell-Aktivierung reicht das erste Signal, die TZR Bindung nicht aus. Gleichzeitig ist ein zweites davon unabhängiges kostimulatorisches Signal von der APZ nötig. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle auf APZ sind CD80 und CD86 (auch als B7.1/B7.2 bezeichnet), die mit dem Rezeptor CD28 auf T-Zellen interagieren. Naive T-Zellen können nur durch professionelle APZ mit kostimulatorischen Signalen aktiviert werden. Zu den professionellen APZ gehören Dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen. Fehlende Kostimulation führt entweder zu einer

Anergie, einem inaktiven Status der T-Zelle, oder zur Apoptose (Antigen-induzierter T-Zelltod). Diese Reaktion der peripheren Toleranz ist notwendig um Gewebezellen vor selbstreaktiven T-Zellen zu schützen, die während ihrer Reifung nicht eliminiert wurden. Autoreaktive T-Zellen können körpereigene Antigene erkennen, werden aber durch die fehlende Kostimulation nicht aktiviert. Wohingegen bereits angeregte T-Effektorzellen ohne Kostimulation ihre Immunantwort liefern, um auf ein bekanntes Antigen schneller zu reagieren. Weiterhin spielt das Membranprotein CD45 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und zwar entfernt es inhibitorische Phosphatreste von Kinasen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Die verschiedenen Isoformen von CD45 stellen einen Oberflächenmarker zur Unterscheidung naiver T-Zellen (CD45RA) und Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO) dar. Diese Gedächtnis-T-Zellen weisen eine niedrigere Aktivierungsschwelle als naive T-Zellen auf. Bei ihnen ist dafür beispielsweise eine 10- bis 50-fach geringere Peptidkonzentration nötig (Pihlgren et al., 1996).

2.4 Autoimmunerkrankungen

Körpereigenes Gewebe wird im gesunden Organismus normalerweise nicht angegriffen. Einerseits wird, wie bereits erwähnt, ein großer Teil der selbstreaktiven T-Lymphozyten während der T-Zellreifung im Thymus eliminiert oder die T-Zellen werden in der Peripherie durch fehlende kostimulatorische Signale anergisch oder apoptotisch. Andererseits tritt neben dieser Selbst-Toleranz noch der Zustand der immunologischen Ignoranz auf, bei dem reaktive Lymphozyten und ihr Zielantigen gleichzeitig vorhanden sind. Aufgrund der Unterrepräsentation oder Unzugänglichkeit des Antigens kommt es jedoch nicht zu einer Aktivierung. Ferner stehen autoreaktive T-Zellen unter der Kontrolle eines Suppressionsnetzwerkes, zu dem die regulatorischen T-Zellen bzw. T-Suppressorzellen gehören. Dieses verhindert die Aktivierung der autoreaktiven Lymphozyten. Wenn das aber nicht gelingt, greifen aktivierte Effektorzellen körpereigenes Gewebe an, zerstören es und können somit schwere Erkrankungen hervorrufen. Bei einem Versagen der Selbst-Toleranz spricht man von Autoimmunerkrankungen.

2.4.1 Bedeutung von T-Zellen

Die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wird als multifaktoriell angesehen, d.h. es sind sowohl Umwelt- als auch genetische Risikofaktoren beteiligt. Obwohl ihre Entstehung und besonders der Schritt der Initiation noch weitgehend unbekannt sind, zeigt sich, dass infiltrierende, klonal expandierte T-Zellen eine zentrale Rolle spielen, besonders bei organspezifischen Krankheiten. Autoreaktivität entsteht wahrscheinlich am häufigsten, wenn das Antigen selektiv in nur einem Gewebe exprimiert wird und nicht bei ubiquitären Antigenen, da gewebespezifische Antigene mit geringer Wahrscheinlichkeit im Thymus eine klonale Deletion von heranreifenden T-Zellen auslösen.

Eine Vielzahl von Komponenten des Immunsystems spielt bei Autoimmunität eine Rolle. Ein Beispiel einer Erkrankung hervorgerufen durch autoreaktive B-Zellen ist Myasthenia gravis.

Acetylcholinrezeptoren der neuromuskulären Endplatte werden durch pathogene Autoantikörper blockiert, verhindern so die Erregungsweiterleitung vom Nerv auf den Muskel, was folglich zu einer Schwächung und späteren Lähmung der betroffenen Muskulatur führt. T-Zellen (T_H2) tragen hier zur Aktivierung der B-Zelle durch Zytokine bei, die die Produktion der Autoantikörper modulieren.

Als Hauptinitiatoren und Hauptmediatoren von Autoimmunerkrankungen gelten jedoch zytotoxische infiltrierende T-Zellen - so auch bei der Multiple Sklerose (MS), eine inflammatorische Erkrankung des Zentralen Nervensystems (Stinissen et al., 1997). Hier durchdringen unter anderem aktivierte $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen gegen das Myelin-basische Protein (MBP), ein Hauptbestandteil der Myelinscheide von Nervenzellen, die Blut-Hirn-Schranke und zerstören die Myelinschicht. In Gehirnläsionen konnten infiltrierende oligoklonal expandierte T-Zell-Populationen gefunden werden (Junker et al., 2007). Auch beim Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (IDDM) sind zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen beteiligt (Tisch und McHewitt, 1996). Sie infiltrieren die Bauchspeicheldrüse und zerstören selektiv die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln. Des Weiteren sind auto-reaktive $CD8^+$ -T-Zellen maßgeblich bei der Muskelerkrankung Polymyositis beteiligt (Hohlfeld und Engel, 1994).

Bei der Gruppe der Spondylarthritiden, die im folgenden Abschnitt abgehandelt werden sollen, ist eine klonale Expansion zytotoxischer $CD8^+$ -T-Zellen mehrmals beobachtet worden, die das betroffene Gewebe infiltrieren und angreifen.

2.4.2 Reaktive Arthritis (ReA)

Eine heterogene Gruppe von entzündlichen Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen wird unter dem Terminus Spondyloarthritis (SpA) zusammenfasst, zu denen die Reaktive Arthritis (ReA) gehört. Spondylitis ankylosans/ankylosierende Spondylitis (AS), auch Morbus Bechterew genannt, ist der wohl bekannteste und häufigste Vertreter. Des Weiteren zählen dazu die Psoriasis-Arthritis, die undifferenzierte SpA und die gemeinsam mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) auftretenden enteropathischen Arthritiden (Dougados und Baeten, 2011). Charakteristische Merkmale sind akute und chronische Entzündungszustände an Gelenken oder Wirbelsäule mit Beteiligung des Knochens oder der Sehnenansätze und/oder einen asymmetrischen Arthritis der unteren Extremitäten. Bei allen Formen ist eine jeweils unterschiedlich starke Assoziation mit HLA-B27 festzustellen. Rheumafaktoren (Autoantikörper gegen IgG-Antikörper) fehlen hingegen gänzlich, weshalb sie oft auch als seronegative SpA bezeichnet werden. Die Prävalenz der SpA in der europäischen Bevölkerung beträgt ca. 2 % (Braun et al., 1998). Damit gehören sie neben der Rheumatoiden Arthritis (RA) zu den häufigsten rheumatischen Erkrankungen.

Die Häufigkeit von ReA in Deutschland wird durchschnittlich mit 0,05 % angegeben, d.h. 0,6-27 von 100000 Einwohnern sind betroffen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern besteht. Die Mehrzahl der Patienten ist bei Ausbruch der Krankheit weniger als 40 Jahre alt. Die ReA gehört zu den Mono- bzw. Oligoarthritis, d.h. es sind weniger als fünf Gelenke betroffen. Am häufigsten ist eine asymmetrische Entzündung in einer unteren Extremität wie z.B. des Knie oder des Sprunggelenkes nachweisbar. Sie tritt

meist akut auf und heilt innerhalb eines halben Jahres aus, kann aber wiederkehren und sogar einen chronischen Verlauf einschlagen. Für HLA-B27-positive Patienten besteht ein höheres Risiko für die Persistenz der Arthritis bzw. einen schwereren oder chronischen Verlauf. Bei 15-30 % der HLA-B27⁺ Patienten mit ReA kommt es zu einer Weiterentwicklung zur AS (Leirisalo-Repo, 1998 und 2005).

Das ausschlaggebende Merkmal einer ReA ist, dass eine Bakterieninfektion des Urogenitaltraktes oder des Gastrointestinaltraktes vorausgeht. Diese Infektion kann wenige Tage oder auch bis zu sechs Wochen zurückliegen und sehr schwach verlaufen, weswegen sie oft nicht mit der Gelenkentzündung in Verbindung gebracht wird. Es handelt sich dabei um verschiedene Gram-negative Enterobakterien wie Salmonellen, Yersinien, Shigellen, Campylobacter oder bei einer Urogenitalinfektion um Chlamydien, wie z.B. *Chlamydia trachomatis* oder auch um Mykoplasmen. Es liegt eine nicht-septische Arthritisform vor, da im Gelenk keine Erreger gefunden werden und der Infektionsherd davon entfernt ist. In der Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit) von ReA-Patienten konnten jedoch bakterielle Antigene oder DNS von Yersinien, Salmonellen oder Chlamydien nachgewiesen werden (Granfors et al., 1989; Granfors et al., 1990; Hammer et al., 1990; Bas et al., 1995). Eine ReA folgt etwa bei 1 - 5 % der Erkrankten nach einem gastro- oder urogenitalen Infekt (Colmegna et al., 2004). Bei etwa einem Drittel aller ReA-Patienten kommt es zusätzlich zur Ausbildung einer klinischen Trias Urethritis (Harnleiterentzündung) und Konjunktivitis (Bindehautentzündung) sowie ein entzündlicher Befall des Achsenskelettes (Iliosakralgelenk-Arthritis). Diese Sonderform wurde als inzwischen nicht mehr aktuellen Begriff des Reiter-Syndrom (Morbus Reiter) bezeichnet.

Die Symptome der ReA reichen von leichten Gelenkschmerzen (Arthralgie) bis zu starken Gelenkentzündungen (Arthritis). Daneben muss für die Diagnose einer Arthritis auch eine Gelenkschwellung und -überwärmung und eine Einschränkung der Beweglichkeit vorhanden sein. Hinzu können eine Entzündung der Sehnenansätze eine Mitbeteiligung innerer Organe sowie eine Dermatose auftreten. Die eingesetzten therapeutischen Maßnahmen sind primär symptomatisch wie Krankengymnastik und die Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika (entzündungshemmende Medikamente), intra-artikulären (in das Gelenk) Corticoiden sowie bei einem chronischen Verlauf die Gabe von Sulfasalazin (Toivanen und Toivanen, 2004). Nur bei einem positiven Erregernachweis ist eine erregerspezifische antibiotische Therapie indiziert.

2.4.3 Bedeutung von HLA-B27

Grundlegend bestimmt der HLA-Polymorphismus die Art und Menge der präsentierten Peptide sowie die Affinität der Peptidbindung, was einen Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und bestimmten HLA-Genotypen erklären kann. Vor allem bei den Spondyloarthritis ist eine enge Assoziation mit HLA-B27 nachgewiesen. Exemplarisch für Erkrankungen mit einer anderen, jedoch geringeren HLA-Assoziation seien hier der Typ-I-Diabetes (mit HLA-DR3, 4, DQ2, 3), die Zöliakie (DR3, 7), die Rheumatoide Arthritis (mit HLA-DR4) oder die Narkolepsie (mit HLA-DQ6) genannt.

2.4.3.1 Assoziation von HLA-B27 mit SpA und ReA

In der Normalbevölkerung tragen ca. 8 % mindestens ein HLA-B27-Allel. Patienten mit ReA sind jedoch zu 30 - 70 % HLA-B27 positiv und bei AS sind es sogar über 90 % (Khan, 2002; Appel et al., 2006). Andere Angaben belaufen sich auf 70 - 90 % HLA-B27 positiver ReA-Patienten, die durch die hohe HLA-B27-Allelfrequenz in Finnland erklärt werden kann (Toivanen und Toivanen, 2004). Ferner zeigt sich eine Korrelation zwischen der Prävalenz einer SpA und der Häufigkeit von HLA-B27 in einer Population. Das Risiko bei HLA-B27⁺ Personen an AS zu erkranken ist im Vergleich zu anderen HLA-B Typen um das Zehnfache erhöht.

Das HLA-B27-Gen und Molekül weisen eine typische MHC-I-Struktur auf (Weiss et al., 1985). Inzwischen sind 105 HLA-B27-Subtypen identifiziert, die von 132 Allelen kodiert werden (<http://hla.alleles.org/>, Juli 2013; Khan, 2013). Die HLA-B27-Subtypen sind entsprechend ihres Sequenzierungszeitpunktes chronologisch von B*2701 bis B*27105 durchnummeriert. Sie sind im Laufe der Evolution direkt oder indirekt aus B*2705 entstanden, größtenteils durch Mutationen in den Exons 2 und 3, die zu Aminosäureveränderungen in der Antigenbindungsgrube führten (López de Castro, 1998). Weltweit ist die Frequenz der Subtypen unterschiedlich verteilt. In Europa haben 90 % aller HLA-B27⁺ Menschen den Subtyp B*2705.

Die 1973 entdeckte Assoziation von HLA-B27 mit AS oder anderen SpA rangiert unter den stärksten zwischen einem HLA-Molekül und einer menschlichen Krankheit (Brewerton et al., 1973). Auffallend ist, dass nicht alle Subtypen von HLA-B27 mit den inflammatorischen Erkrankungen gekoppelt sind (Feltkamp et al., 1996). Die häufigsten Subtypen (B*2702, B*2704 und B*2705) sind in Populationsstudien mit AS in gleicher Häufung gekoppelt, während bei den Subtypen B*2703, B*2706 und B*2709 keine Assoziation beobachtet wurde (Uchanska-Ziegler et al., 2012). Interessant in diesem Zusammenhang ist dabei, dass sich der Subtyp B*2705 von dem nicht AS-assoziierten Subtyp B*2709 nur in einer Aminosäure an Position 116 unterscheidet (Asp116 in B*2705 vs. His116 in B*2709) (Hülsmeier et al., 2002; D'Amato et al., 1995). Dieser minimale Konformationsunterschied der Subtypen bedingt ein verschiedenes Peptidligandenspektrum und T-Zell-Repertoire (Hülsmeier et al., 2004).

Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass durch die Entwicklung neuerer Forschungsmöglichkeiten in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) noch andere Assoziationen mit AS oder SpA aufgedeckt werden konnten, die folgerichtig die Theorien zur Pathogenese der SpA in einem größeren Zusammenhang beleuchten können. Viele Hypothesen sind dabei eng mit der Funktion von HLA-B27 verbunden und im Allgemeinen ist die Pathogenese nur durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren der angeborenen und erworbenen Immunantwort zu erklären, die autoinflammatorisch und autoimmun Entzündungen in spezifischen Körperregionen verursachen. Um Beispiele zu nennen, ist es zum Einen die Assoziation von AS mit *ERAP1* (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*) in Abhängigkeit von HLA-B27, oder mit dem Rezeptor *IL23R*, der an der Differenzierung von proinflammatorischen Th17 CD4⁺ Zellen beteiligt ist. Die Rolle von HLA-B27 bei Autoimmunerkrankungen und die bisher erworbenen Erkenntnisse werden genauer vorgestellt, da die Fragestellung dieser Arbeit auf das abnormale Verhalten der untersuchten T-Zellen in Abhängigkeit von pHLA-B27 zu sehen ist.

2.4.3.2 Mögliche Pathomechanismen von HLA-B27

Die enge Assoziation legt den Schluss nahe, dass HLA-B27 eine entscheidende Beteiligung bei der Entstehung von SpA und ReA hat (Appel et al., 2006). Vorrangig ist die Funktion des HLA-B27-Moleküls Peptidantigene den CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren, was demzufolge ebenfalls eine entscheidende Bedeutung der T-Zellen an der Pathogenese aufzeigt. Obwohl auf diesem Gebiet viele Studien stattfanden, sind der genaue Mechanismus dieser HLA-Assoziation und die pathogenetische Rolle von HLA-B27 auch 40 Jahre nach ihrer Entdeckung immer noch weitgehend unklar und bleibt Thema intensiver Untersuchungen (Ramos und Lopéz de Castro, 2002b; Dougados und Baeten, 2011; McHugh und Bowness, 2012; Lopéz de Castro, 2014).

Der folgende Überblick soll die unterschiedlichen Hypothesen und dazu gewonnene Erkenntnisse kurz beleuchten. Bei einigen Theorien wird das HLA-B27-Molekül selbst für das abnormale Verhalten der T-Zellen verantwortlich gemacht, da es im Vergleich zu den meisten anderen HLA-I-Molekülen einige untypische Eigenschaften aufweist (Bowness et al., 1999). Andere Thesen rücken die Spezifität der Peptidbindung von HLA-B27 in den Vordergrund.

Fehlfaltung von HLA-B27 im ER

Bei der Zusammenlagerung des HLA-B27-Moleküls im ER kommt es häufig zu einer Fehlfaltung (Mear et al., 1999). Die schweren Ketten von HLA-B27 sammeln sich im weiteren Verlauf zu Proteinaggregaten im ER zusammen. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken eines ungepaarten Cysteins an Pos. 67 innerhalb der HLA-B27-Antigenbindungsgrube lagern sich die fehlgefaltete HLA-B27-Moleküle zu Oligomeren zusammen (Dangoria et al., 2002). Die Bildung von Disulfidbrücken wird auch an anderen ungepaarten Cysteinen begünstigt (Lenart et al., 2012). Eine effektive Antigenpräsentation an der Zelloberfläche ist nicht mehr möglich. Die Akkumulation fehlgefalteter oligomerer Ketten löst eine Stressreaktion im ER aus, die zur Folge eine Aktivierung des Regulationsmechanismus UPR (*unfolded protein response*) hat (Turner et al., 2005). Dieser Mechanismus resultiert in der

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der wiederum die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α induziert.

HLA-B27 Homodimere an der Zelloberfläche

Das ungepaarte potentiell reaktive Cystein an Pos. 67 erlaubt zudem die Expression eines HLA-B27-Homodimers auf der Zelloberfläche (Allen et al., 1999; Kollnberger et al., 2002; Bird et al., 2003). Diesem Homodimer fehlt die Paarung mit β_2 M und die Bindung von Peptiden. Es wird spekuliert, dass eventuell fehlgepaarte HLA-B27-Homodimere als antigene Determinante erkannt werden. Postuliert wurde zuerst, dass sogenannte Immunglobulin-like-Rezeptoren auf Monozyten oder B-Zellen, die Antigen-unabhängig diese Homodimere binden eine Immunantwort induzieren (Kollnberger et al., 2004). Es wurden T-Zellen von Patienten mit SpA identifiziert, die das HLA-B27-Homodimer erkennen (Bowness, 2002). Es konnte eine CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen die wahrscheinlich dem MHC-II-Molekül strukturell ähnlichen HLA-B27-Homodimere nachgewiesen werden, die eine Entzündung ebenfalls induzieren könnten (Boyle et al. 2001). Als Ligand wurde schließlich KIR3DL2 (KIR: *Killer cell immunoglobulin-like receptor*) identifiziert, der auf NK-Zellen und CD4⁺T-Zellen vorhanden ist. In HLA-B27⁺ SpA Patienten wurde ein erhöhtes Vorkommen an NK und T-Zellen mit KIR3DL2 nachgewiesen und ihre Aktivierung konnte direkt über eine Interaktion mit den Homodimeren induziert werden (Chan et al., 2005). KIR3DL2 bindet stärker an HLA-B27-Homodimere und freie schwere Ketten des HLA-B27-Moleküls als an Peptid-abhängige HLA-A3- und HLA-A11-Moleküle (Wong-Baeza et al., 2013).

In einem anderen Zusammenhang wurde die Beteiligung von NK-Zellen untersucht. NK-Rezeptor KIR3DL1 erkennt eine besondere Konformation viraler Peptide immundominant gebunden an HLA-B27 (Stewart-Jones et al., 2005). Interaktionen zwischen pHLA-B27, T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) und NK-Zellen könnten somit die HLA-B27-vermittelte T-Zell-Antwort in arthritogenen Infektionen modulieren (Lopéz de Castro, 2005).

HLA-B27 transgene Ratte

Anzeichen für den Einfluss des HLA-B27-Moleküls an der Pathogenese von SpA zeigten sich auch durch das Tiermodell der HLA-B27-transgenen Ratte. Bei einem bestimmten Rattenstamm kam es im Vergleich zu anderen HLA-I transgenen Tieren durch die Integration einer sehr hohen Anzahl an Kopien des HLA-B27-Gens zu Spondylarthropathie-ähnlichen Veränderungen im Gelenk, Darm oder Haut (Hammer et al. 1990). Abhängig von der HLA-B27-Expression variierte der Schweregrad der Symptome (Taurog et al., 1993). Wurden die Tiere unter keimfreien Bedingungen gehalten, kam es zu keinen Krankheitserscheinungen, was auf den Zusammenhang von mikrobiellen Antigenen und HLA-B27 hindeutet (Taurog et al., 1994). Da die Krankheit jedoch nur bei Ratten mit einer extrem hohen Kopienanzahl induziert wird, wird dieses Tiermodell kontrovers diskutiert. Widersprüchlich zu anderen Hypothesen erscheint hier auch das Auftreten der Krankheitsanzeichen unabhängig von CD8⁺T-Zellen (May et al., 2003). Bei einem weiteren Rattenmodell zeigte sich, dass eine Spondylarthropathie-ähnliche Erkrankung durch eine Überexpression von β_2 M mit Hilfe einer hohen Kopienzahl in Verbindung mit HLA-B27-Expression ausgelöst werden konnte (Tran et al., 2006). Es blieb bisher jedoch unklar, wie übersteigertes β_2 M an der Entstehung beteiligt ist (Colbert et al., 2014).

Höhere Überlebensrate von Mikroben in HLA-B27-Zellen

Intrazelluläre Bakterien überleben und persistieren in HLA-B27⁺ Zellen länger als in anderen HLA-I⁺ Zellen. Es wurde gezeigt, dass HLA-B27-Transfektantenzellen weniger Stickoxid als Kontrolltransfektanten produzieren (Laito et al., 1997). Beobachtungen in vitro zeigten auch, dass die Vermehrung von *Salmonella enteritides* in HLA-B27⁺ Monozyten größer als in HLA-A2⁺-Monozyten war (Penttinen et al., 2004). HLA-B27 könnte also dazu beitragen mit einer verminderten Immunantwort durch ineffiziente Peptidbeladung die Eliminierung von Bakterien zu verzögern.

Ungewöhnliches Peptidrepertoire

Im Zuge neuerer GWAS wurden noch weitere Assoziationen von AS festgestellt, wobei die stärkste darunter eine Assoziation mit verschiedenen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP *single nucleotide polymorphism*) im Gen für Aminopeptidase 1 im ER (*ERAP1*) ist (Burton et al., 2007). Diese Assoziation ist abhängig von HLA-B27, da sie nur in HLA-B27⁺ AS-Patienten nachgewiesen wurde (Evans et al., 2011). Die Funktion von ERAP1 ist Peptide im Lumen des ER am N-Terminus so zu kürzen, dass sie auf HLA-I-Moleküle beladen werden können. Eine kürzlich erschienene Studie wies Assoziationen mit drei weiteren Genen für Aminopeptidasen nach: eine zytoplasmatische und zwei ER-residente (IGAS et al., 2013). Allele mit reduzierter Enzymaktivität wirken protektiv gegen AS (Haroon et al., 2012; Garcia-Medel et al., 2012).

In diesen Zusammenhang passt auch die Beobachtung, dass das HLA-B27-Molekül im Vergleich zu anderen HLA-I-Molekülen die Eigenschaft besitzt auch längere Peptide (bis zu 33 Aminosäuren) zu präsentieren (Urban et al., 1994). Daraus folgern lässt sich zusätzlich eine nicht starre Konformation von gefaltetem pHLA-B27, was wiederum Auswirkungen zur Fehlfaltungen oder Homodimer-Formationen haben könnte (McHugh und Bowness, 2012).

Arthritogene Peptid-Hypothese

Der klassische und meist untersuchte Erklärungsversuch stellt das arthritogene Peptid-Modell dar. Die arthritogene Peptid-Hypothese postuliert, dass autoreaktive T-Zellen, die durch körperfremde Antigene aktiviert wurden, endogene Peptide im Gelenk, die von HLA-B27 präsentiert werden, erkennen können und somit die Spondyloarthritis verursachen (Benjamin und Parham, 1990; Kuon und Sieper, 2003). Es wurden mehrfach klonale Expansionen von Antigen-spezifischen T-Zellen innerhalb des Gelenks beobachtet, die folglich die Entzündungsreaktionen verursachen könnten (Sieper et al., 1993, May et al., 2000, Duchmann et al., 2001). Dieser Ansatzpunkt ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

In Anfangsstudien wurden CD8⁺ T-Zellklone von ReA- und AS-Patienten gegen gesamte Proteome verschiedener Bakterien charakterisiert, die spezifisch gegen bakterielle und Selbst-Antigene waren (Hermann et al., 1993). Der Erklärungsansatz dabei ist, dass die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Strukturen dadurch unterbrochen wird, dass HLA-Determinanten und infektiöse Mikroorganismen sich ähneln. Durch die Immunantwort gegen die Mikroorganismen kommt es zu einer Kreuzreaktion mit eigenen pHLA-Molekülen. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen viralen oder bakteriellen Antigenen mit einem Selbst-Antigen wird als molekulare Mimikry bezeichnet (Oldstone, 1987). Es gibt

mittlerweile Beispiele für eine molekulare Mimikry bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. zwischen dem basischen Myelinprotein und verschiedenen viralen Peptiden (Wucherpfennig und Strominger 1995). Eine Peptidsequenz von HLA-B27 zeigt Homologien zur Nitrogenase von *Klebsiella pneumoniae* auf und wird als kreuzreaktives Epitop von Autoantikörpern aus Patienten mit AS und Reiter Syndrom erkannt (Schwimmbeck et al., 1987). Es konnte in diesem Zusammenhang jedoch gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktion nicht unbedingt auf die homologen Sequenzen, sondern auf flankierende Peptidsequenzen zurückzuführen ist (Lahesmaa et al., 1992). Bei der AS konnte ein kreuzreaktives Antigen zwischen einem Epitop des LMP2-Proteins aus dem Epstein-Barr-Virus mit einem Selbstantigen aus dem vaso-aktiven intestinalen Peptid-Rezeptor (VIPR1) nachgewiesen werden (Fiorillo et al., 2000). Dazu wurde ein weiteres Selbstantigen pGR des Glucagon-Rezeptors mit Homologien zu VIPR1 und pLMP2 aufgedeckt, dass durch das Auftreten zweier verschiedener Konformationen die arthritogene Hypothese aufgrund von molekularer Mimikry unterstützt (Rückert et al., 2006).

Zur Aufdeckung eines potentiell arthritogenen Peptids werden autogene Peptide untersucht wie z.B. Proteoglycane im Gelenk. Eine spezifische ZTL-Aktivierung durch einige HLA-B27 präsentierte Epitope von menschlichem Aggrecan deutet auf eine mögliche Induktion der Entzündungen im Gelenk bei SpA hin (Kuon et al., 2004). Hypothetische Peptide des Knorpelgewebes wurden zur Stimulation von CD8⁺ T-Zellen von AS-Patienten untersucht und zwei immundominante Peptide könnten eine Relevanz in der Pathogenese von AS aufweisen (Atagunduz et al., 2005).

Des Weiteren wurden CD8⁺-T-Zellen in AS-Patienten identifiziert, die autologe Peptide erkennen, welche von der α_2 -Domäne der schweren Kette von HLA-B27 gewonnen wurden. Das besondere dieser Peptide, die das HLA-B27-Binde-Motiv tragen und von HLA-B27 selbst präsentiert werden, ist, dass sie mit bakteriellen Antigenen Sequenzhomologien aufweisen und so als Antigenkandidaten mit molekularer Mimikry als arthritogen in Frage kommen (Frauendorf et al., 2003).

Inzwischen sind weitere mögliche kreuzreaktive HLA-B27-Peptide mit Sequenzhomologien zu Antigenen aus dem Gelenk oder Ähnlichkeiten zu bakteriellen Antigenen aufgedeckt worden. Durch eine Analyse des HLA-B27-Peptid-Repertoires aus einem Fundus von 1268 spezifischen HLA-B27-Peptiden konnten zwar viele Peptide mit großer Homologie zu Bakterienantigenen gefunden werden und eine Charakterisierung des HLA-B27-Binde-Motivs näher eingegrenzt werden, aber kein Peptid eindeutig als potentieller Auslöser nachgewiesen werden (Ben Dror et al., 2010).

Speziell bei der ReA kann zwar die vorangegangene Infektion mit einem bakteriellen Erreger ein Hinweis auf das Auslösen der Immunantwort liefern, trotzdem wurde auch hier noch kein arthritogenes Peptid identifiziert. Aktivierte synoviale T-Zellen konnten nachgewiesen werden, die durch HLA-B27 restringierte Peptide des Hitzeschockproteins von *Yersinia enterocolitica* stimuliert wurden (Ugrinovic et al., 1997). Die Suche nach einem potentiellen arthritogenen Peptid bei ReA weist unter anderem die Schwierigkeit auf, dass z.B. nach einer vorausgegangenen Infektion mit *Chlamydia trachomatis* alle 904 chlamydiellen Proteine als potentiell Kreuzreaktivität induzierende Antigene in Frage kommen und man so förmlich die Nadel im Heuhaufen suchen muss. Einige HLA-B27 restringierte Peptide von *Chlamydia* konnten identifiziert, die CD8⁺-T-Zellen stimulieren konnten und als pathogen kreuzreaktiv gelten könnten (Kuon et al., 2001, Ramos et al., 2002a). Dabei wurden

hauptsächlich Peptide untersucht, die hypothetisch auf HLA-B27 präsentiert werden und eine ZTL-Aktivierung auslösen (Kuon und Sieper, 2003). Mittlerweile konnten auch endogen prozessierte T-Zell Epitope von *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen werden, die homolog zu Selbst-Peptiden sind und von HLA-B27 präsentiert werden (Cragolini et al., 2009). Dabei ist nicht bekannt, ob diese Peptide naturgemäß auch in Chlamydia-infizierten Zellen präsentiert werden. Generell stellt eine direkte Identifikation von HLA-B27 präsentierten bakteriellen Peptiden eine große Schwierigkeit dar, da nach einer Infektion die Peptide in nur sehr geringen Mengen präsentiert werden (Marcilla und López de Castro, 2008). Neuere Möglichkeiten durch Massenspektrometrie-Verfahren erlauben indessen die Identifikation von weiteren potentiellen bisher nicht vorhergesagten Peptiden mit molekularer Mimikry, die nachweisbar an HLA-B27 gebunden sind und von T-Zellen erkannt werden (Alvarez-Navarro et al., 2013).

Warum es letztendlich zu einer Entzündung im Gelenk bis hin zu einem Angriff und Zerstörung von körpereigenen Strukturen kommt, konnte noch nicht geklärt werden. Keine der beschriebenen Theorien und Studien zur Aufklärung der Assoziation von HLA-B27 mit SpA ist allein ausreichend seine Beteiligung an der Krankheitsentstehung zu erklären. Es stellt sich die Frage, warum aktivierte kreuzreaktive CD8⁺ T-Zellen die Gelenkregion infiltrieren und durch zytotoxische Reaktionen spezifisch Knorpelstrukturen zerstören und an einer Arthritis beteiligt sind. Die Antigen-spezifischen ZTL werden durch ein HLA-B27 restringiertes arthritogenes Peptid aktiviert. Das antigene Peptid ist potentiell ein bakterielles oder gelenkspezifisches Antigen, welches sich durch molekulare Mimikry ähnelt. Zur Aufklärung des krankheitsinduzierenden arthritogenen Peptids werden in der vorliegenden Arbeit die infiltrierten und expandierten CD8⁺ T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von ReA-Patienten, die vermutlich an inflammatorischen Prozessen beteiligt waren, herangezogen. Die Charakterisierung dieser T-Zellen sollte einen pathogenen TZR dieser Autoimmunkrankheit identifizieren. Ihre klonalen rekombinant hergestellten T-Zell-Rezeptor-Moleküle sollten als Werkzeug verwendet werden arthritogene Peptide aufzuspüren und Hinweise auf das induzierende Antigen zu erlangen.

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der unabhängige Nachweis von gelenkinfiltrierten klonal expandierten CD8⁺ T-Zellen in isolierter Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit, SF) aus dem Knie von Reaktiven Arthritis Patienten, führte zu der Annahme, dass diese den pathogenen T-Zell-Rezeptor spezifisch für ein HLA-B27 restringiertes arthritogenes Peptid tragen (Dulphy et al., 1999; May et al., 2002). Die Analyse mit Hilfe der CDR3-Spektratypisierung offenbarte eine TZR β -Kette mit den rekombinierten Gensegmenten von TRBV1 und TRBJ2.3. Es konnte eine einheitliche so genannte kanonische ReA-TZR β -Konsensussequenz mit einer Länge von 15 Aminosäuren in der kodierenden CDR3-Region definiert werden, da die typische TZR β -Kette des T-Zell-Klons bei fünf von sechs untersuchten Patienten übereinstimmte (V β 1-CASSVG(VII/L)(Y/F)STDTQYF-J β 2.3).

In der vorliegenden Arbeit sollte der vollständige ReA-klontypischen T-Zell-Rezeptor charakterisiert und die bislang unbekannte TZR β ^{ReA}-assoziierte α -Kette identifiziert werden. Zur Verfügung standen die cDNS der Synovial-T-Zellen von verschiedenen ReA-Patienten, die den VB1⁺ expandierten Klon der klontypischen TZR β ^{ReA}-Kette enthielten. Die Aufklärung der infiltrierten klonal expandierten TZR^{ReA} T-Zellen sollte die autoaggressiven CD8⁺ T-Zellen erfassen, die an inflammatorischen Prozessen im Gelenk beteiligt sind.

Die Identifizierung potentiell arthritogener Peptide kann über die Verwendung des potentiell pathogenen TZR als Werkzeug erfolgen. Deshalb sollten die identifizierten klontypischen TZR^{ReA} α - und β -Ketten als rekombinante TZR^{ReA}-Moleküle mit Hilfe von geeigneten Expressionsvektoren in einem in vitro System der TZR-defizienten T-Zell-Maushybridomzelllinie 58 α β ⁻ in Verbindung mit dem Korezeptor CD8 exprimiert werden. Nach einem Nachweis auf Funktionalität sollten die stabilen TZR^{ReA}-Transfektanten herangezogen werden verschiedene antigene Peptide auf Aktivierbarkeit des TZR^{ReA} zu untersuchen.

Die etablierten rekombinanten TZR^{ReA}-Zellen sollten schließlich für eine Suche nach dem arthritogenen Peptid im Zusammenhang mit HLA-B27 zum Einsatz kommen. Um unvor-
eingenommen T-Zell-Antigene zu identifizieren, wurden dafür Plasmid-kodierte kombinatorische Peptidbibliotheken verwendet, die von HLA-B27⁺-Zellen präsentiert wurden. Die Erkennung eines Antigens sollte dabei über die TZR^{ReA}-Transfektanten, die zusätzlich mit einem durch TZR-Aktivierung induzierbaren grün fluoreszierenden Reporterproteins versehen waren, im Fluoreszenzmikroskop erfolgen (nach Siewert et al., 2012). Ein potentiell arthritogenes Peptid auf HLA-B27 sollte durch die Kennzeichnung aktivierter grüner TZR^{ReA}-Hybridomzellen aufgedeckt, isoliert und identifiziert werden. Die künstlich generierten identifizierten Peptide, die eine Aktivierung des pathogenen TZR^{ReA} auslösten, könnten den Rückschluss auf naturgemäß vorkommende Antigene ermöglichen.

4 Material

4.1 Nukleinsäuren

4.1.1 Nomenklatur der TZR

Die Bezeichnung der Gensegmente für die variablen Bereiche der α - und β -Ketten des TZR wurde von Arden et al. (1995) übernommen. Generell werden sie in Unterfamilien zusammengefasst, wenn mindestens 75 % ihrer Nukleotidsequenz identisch sind, bzw. in Untergruppen, wenn sie zu mehr als 50 % übereinstimmen.

Die Nomenklatur für die Sequenzen der verschiedenen Genfamilien der TZR-Ketten wurde in den letzten Jahren häufig verändert. In der IMGT-Datenbank (<http://www.imgt.org/>) findet man eine Vereinheitlichung und umfassende Darstellung aller Gene der TZR, da eine neue Nomenklatur für die TRAV- und TRBV-Gene aufgrund der Anordnung im Genloкус und nicht ursprünglich nach dem Entdeckungszeitpunkt eingeführt wurde. Die Analyse der gefundenen Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen der umgelagerten cDNS der α - und β -Ketten erfolgte mit Hilfe der NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oder der IMGT-Datenbank. Die folgende Tabelle listet die Publikationen auf, deren Bezeichnung für die hier verwendeten Sequenzen verwendet wurde. Die Zugriffsnummern der Sequenzen in der NCBI/Nucleotide-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) sind ebenfalls angegeben:

Sequenzbereich	Bezeichnung cDNS/Protein in der Arbeit	Bezeichnung des Gens in der Arbeit	Referenz	Zugriffsnummer
variable Region der TZR β -Kette	VB/V β	TRBV	Arden et al., 1995 Rowen et al., 1996	NG_001333 L36092
diversity und joining Regionen der TZR β -Ketten	DJB1.x/DJ β 1.x; DJB2.x/DJ β 2.x	TRBD1/TRBJ1.1-1.6 TRBD2/TRBJ2.1-2.7	Toyonaga et al., 1985	M14158 M14159
konstante Region der TZR β -Kette	CB/C β 1CB/C β 2	TRBC1 TRBC2	Tunnacliffe et al., 1985	M12887 M12888
variable Region der TZR α -Kette	VA/V α	TRAV	Arden et al., 1995	NG_001332
joining Region der TZR α -Kette	JA/J α	TRAJ	Koop et al., 1985	M94081
konstante Region der TZR α -Kette	CA/C α	TRAC	Yoshikai et al., 1985	X02883

4.1.2 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Größe	Resistenzgene	Bezugsquelle / Referenz
pCR® II-TOPO®	4,0 kb	amp ^R kan ^R	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
pCR® 2.1-TOPO®	3,9 kb	amp ^R kan ^R	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO®	5,1 kb	amp ^R neo ^R	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
pcDNArc-spacer	7,6 kb	amp ^R blast ^R	PD Dr. Klaus Dornmair (Martinsried) Siewert et al., 2012
pcDNAlib (N24, N27, N30, N39) pcDNA6/V5-His-A-PECP Insertionen: Peptide-library- kodierende Region <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	5,1 kb	amp ^R blast ^R	Klaus Dornmair (Martinsried) Siewert et al., 2012
pcDNA-NFAT-sGFP	7,4 kb	amp ^R blast ^R	Klaus Dornmair (Martinsried) Siewert et al., 2012
pBRdel (pBR328 Del <i>Pvu</i> II/ <i>Eco</i> R V; ohne Chloramphenicol ^R)	3,4 kb	amp ^R tet ^R	Klaus Dornmair (Martinsried)
RSV5neo	5,1 kb	amp ^R neo ^R	Klaus Dornmair (Martinsried) Long et al., 1991
RSV5hygro	5,1 kb	amp ^R hygro ^R	Klaus Dornmair (Martinsried) Long et al., 1991
pTM-HLA-B27 Insertion: HLA-B27 als 6 kb <i>Eco</i> RI / <i>Bam</i> HI Fragment		amp ^R neo ^R	Catherine Botteron, Diplomarbeit
pUC18-β2-Mikroglobulin Insertion: β2-Mikroglobulin-Gen als 15 kb <i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I Fragment		amp ^R	Matthias Ulbrecht, Dissertation

Die Vektorkarten einiger verwendeter Plasmide sind im Anhang unter Abschnitt 9.3 dargestellt. Die resultierenden Expressionsvektoren der hier gelisteten Plasmide werden im Ergebnisteil beschrieben.

Eigenschaften der verwendeten Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken pcDNAlib

Bezeichnung pcDNAlib	Kodierte Peptidlänge/ Aminosäuresequenz	Theoretische Aminosäure- kombination	Anzahl der Klone (Maximale Peptidkomplexität)	Hersteller
pcDNAlib-N24	Oktamer/ X X X X X X X X	$20^8=2,56 \times 10^{10}$	$229,25 \times 10^6$	Geraldine Rühl
pcDNAlib-N27	Nonamer/ X X X X X X X X X	$20^9=5,12 \times 10^{11}$	95×10^6	Katherina Siewert
pcDNAlib-N30	Dekamer/ X X X X X X X X X X	$20^{10}=1,024 \times 10^{13}$	$27,65 \times 10^6$	Geraldine Rühl
pcDNAlib-N39	13-mer/ X X X X X X X X X X X X X	$20^{13}=8,192 \times 10^{16}$	$277,83 \times 10^6$	Anna Niedl

4.1.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland synthetisiert. Die Endkonzentration betrug bei allen Primern 100 pmol / μ l bzw. 100 μ M. Im Folgenden sind die Nukleotidsequenzen aller selbst ausgewählten Oligonukleotide, ihre Bezeichnung und die Sequenz in 5' \rightarrow 3' Orientierung angegeben. Rechts davon ist die Spezifität, die Hybridisierungsregion, die Länge, der GC-Anteil in Prozent %, sowie die Schmelztemperatur (T_M) aufgelistet. Kursiv ist die Erkennungssequenz der spezifischen Restriktionsenzyme. Die Nukleotidsequenzen der Oligonukleotide, die von Veröffentlichungen übernommen wurden, befinden sich im Anhang unter Abschnitt 9.2.

Spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation der TZR β -Kette VB1JB2.3CB:

V β 1neu	GAG AGA GCA AAA GGA AAC ATT CTT GAA	5'-Primer in TRBV1 27-mer/37 %/60,4°C
J β 2.3	TGC CTG GGC CAA AAT ACT	3'-Primer in TRBJ2.3 18-mer/50 %/53,7°C
BC_290-268	CCT TTT GGG TGT GGG AGA <i>TCT</i> CT	3'-Primer in TRBC (<i>Bgl</i> II) 23-mer/52,2 %/62,4°C

Spezifische Oligonukleotide des Prä-Amplifikationschrittes der Einzelzellen 2.5.2.1

V β 1_for_out	TGT ACT GGT ACC AAC AGA GC	5'-Primer in TRBV1 25-mer/50 %/57,3°C
V β 1_for_in	GGA GAA GAG AGA GCA AAA GG	5'-Primer in TRBV1 25-mer/50 %/57,3°C
C_beta_RT	GAA GAA GCC TGT GGC C	3'-Primer im TRBC-Element 16-mer/62,5 % /54,3°C
C_alpha_RT	GCC ACA GCA CTG TTG C	1. Schritt der Einzelzell-PCR 16-mer/62,5 %/54,3°C

Spezifische Oligonukleotide für die Vollenlängen cDNS der sechs TZR α -Kandidaten-Ketten

5'-Primer ab Leader-Bereich VA-Sequenz mit *Sa*I-Schnittstelle, Kozak-Sequenz und Startkodon

TRAV3L	<i>GTC GAC</i> CAT GGA AAC TCT CCT GGG AG	26-mer/57%/64°C
TRAV7L	<i>GTC GAC</i> ATG TGG GGA GTT TTC CTT	25-mer/52 %/64,6°C
TRAV8L	<i>GTC GAC</i> AGG ATG ACA TCC ATT CGA GCT G	28-mer/53,6 %/68°C
TRAV12L	<i>GTC GAC</i> AAC ATG CTG ACT GCC AGC CTG	27-mer/59,3 %/69,5°C
TRAV23L	<i>GTC GAC</i> GGA ATG GAG ACC CTC TTG GG	26-mer/61,5%/69,5°C
TRAV25L	<i>GTC GAC</i> AGG ATG CTC CTT GAA CAT TT	26-mer/46,2 %/63,2 °C
3'-Primer: TCRAC	GCA GAC AGA CTT GTC ACT GG	20-mer/55 %/59,4°C

Spezifische Oligonukleotide zur Bestimmung der CDR3-Sequenzen verschiedener Patienten

JA7rev	CCC AAA AGC GAG TCT GTT	3'-Primer im JA7-Element 18-mer/50 %/53,7°C
JA20rev	GCT GAG CTT GTA GTC GTT AG	3'-Primer im JA20-Element 20-mer/50 %/57,2°C
JA24rev	CAA ACT GCA ATT TCC CCC AGC	3'-Primer im JA24-Element 21-mer/52,4 %/59,8°C
JA28_2rev	GTG AGT TGG TAA CTC CCA GCC CC	3'-Primer im JA28-Element 23-mer/60,9%/66°C
JA52rev	CTT TCC ATA GTC AGT ACC ACC	3'-Primer im JA52-Element 21-mer/47,6 %/ 57,9°C

Oligonukleotide zur Mutagenese der klonierten LVACA-Sequenzen zur Beseitigung der Pvu II-Schnittstellen (CAG CTG) durch Einfügen einer stillen Mutation

VA8_Pvu_for	CCT GTG GCT GCA GCT TGA CTT GGT GAA TGG AG	5'-Primer Mutagenese CTG -> CTT 32-mer/56,3%/72°C
VA8_Pvu_rev	CTC CAT TCA CCA AGT CAA GCT GCA GCC ACA GG	3'-Primer 32-mer/56,3%/72°C
VA23_Pvu_for	CCT TTG GCT GCA GCT CCA ATG GGT GAG CAG C	5'-Primer Mutagenese CTG -> CTC 31-mer/61%/73,5°C
VA23_Pvu_rev	GCT GCT CAC CCA TTG GAG CTG CAG CCA AAG G	3'-Primer 31-mer/61%/73,5°C
VA25_1Pvu_for	CTT GTG GAT GCA ACT GAC ATG GGT CAG TGG	5'-Primer Mutagenese CAG->CAA 30-mer/53%/69,5°C
Va25_1Pvu_rev	CCA CTG ACC CAT GTC AGT TGC ATC CAC AAG	3'-Primer 30-mer/53%/69,5°C
VA25_2Pvu_for	CAG TGG TCA ACA GCT CAA TCA GAG TCC TC	5'-Primer Mutagenese CTG->CTC 29-mer/51,7%/68°C
VA25_2Pvu_rev	GAG GAC TCT GAT TGA GCT GTT GAC CAC TG	3'-Primer 29-mer/51,7%/68°C

Oligonukleotide markiert mit Fluoreszenzfarbstoffen für die Spektroskopie

TCRAC-Cy5	GCA GAC AGA CTT GTC ACT GG	3'-Primer, Cy5-Modifikation 20-mer/55 %/59,4°C
JA7rev_FAM	CCC AAA AGC GAG TCT GTT	3'-Primer, 5'-FAM-Modifikation 18-mer/50 %/53,7°C
JA20rev_FAM	GCT GAG CTT GTA GTC GTT AG	3'-Primer, 5'-FAM-Modifikation 20-mer/50 %/57,2°C
JA24rev_TET	CAA ACT GCA ATT TCC CCC AGC	3'-Primer, 5'-TET-Modifikation 21-mer/52,4 %/59,8°C
JA28rev_TET	GTG AGT TGG TAA CTC CCA GCC CC	3'-Primer, 5'-TET-Modifikation 23-mer/60,9%/66°C
JA52rev_FAM	CTT TCC ATA GTC AGT ACC ACC	3'-Primer, 5'-FAM-Modifikation 21-mer/47,6 %/ 57,9°C

Oligonukleotide zur Mutagenese von RSV5hygro zur Beseitigung des VAJA-Elements

RSVhygro_for	TCG ACT GAG GTG ATA TCG CCT TCC AG	5'-Primer Sal I-Eco RV-Pvu II Modifikation: 5'-Phosphat 26-mer/53,8 %/66,4°C
RSVhygro_rev	CTG GAA GGC GAT ATC ACC TCA G	3'-Primer Sal I-EcoRV-PvuII Modifikation: 5'-Phosphat 22-mer/54,5 %62,1°C

Oligonukleotide für die PCR-Analyse des Vektors RSV5hygro

Hygro_LTR	ATT CAC CAC ATT GGT GTG CAC CTC	5'-Primer vor VAJA-Region 24-mer/50 %/62,7°C
TCA4	GTT GCT CTT GAA GTC CAT AGA CC	3'-Primer in CA-Region 23-mer/47,8 %/60,6°C

Oligonukleotide zur Herstellung der klontypischen TZR^{ReA}-Kette

ReA β 1-5'	CAG CGT AGG AGT ATA CAG CAC AGA TAC	5'-Mutagenese-Primer 27-mer/48,1 %/65°C
ReA β 1-3'	GTA TCT GTG CTG TAT ACT CCT ACG CTG	3'-Mutagenese-Primer 27-mer/48,1 %/65°C

4.1.4 Größenstandards

In der Agarosegelelektrophorese wurde für die Größenbestimmung von DNS-Fragmenten der 1 kb Plus (1kb+) Längenstandard der Firma Invitrogen BV (Groningen, Niederlande) verwendet.

In der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde für die Spekatypisierung am ALFexpress sequencer als Standard der ALFexpress™ Sizer™ 50-500 bp von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) verwendet.

Bei der VA-JA-Spekatypisierung am Kapillarsequenzierer MegaBACE™ 1000 Amersham Pharmacia Biotech wurde der MegaBACE™ ET400-R size standard eingesetzt.

4.1.5 Übersicht der verwendeten RNS bzw. cDNS

Die cDNS der Synovialzellen (SFMC) bzw. von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) der verschiedenen Patienten war schon zu Beginn meiner Arbeit im Labor vorhanden und stammte von Elke Frauendorf von der Universitätsklinik Mainz. Die Nummern beziehen sich demzufolge auf diese Patienten ID und die Nummerierung der Patienten Nr. 14, 15, 21, 22, 24 und 7 entsprechen der in May et al. (2002). Die RNS der Patientin 006-2.5.2.1 wurde aus V β 1-vorsortierten Synovialzellen von Sarah Kubis isoliert und bei -80°C gelagert. Daraus wurde die weiter verwendete cDNS 006-2.5.2.1 hergestellt und für die Kontrolle wurde im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit RNS aus peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut einer gesunden HLA-B27⁻ Spenderin (PBMC EHW) gewonnen.

Bezeichnung	Art (PBMC/ SFMC)	Diagnose, Geschlecht (w/m), Erreger	HLA-B27 (+/-)	TRBV1+ Klon ^{ReA} (+/-)
cDNS 006-2.5.2.1	V β 1 ⁺ CD8 ⁺ sortierte SFMC	aReA, w, Shigella sonnei	+	+
cDNS Nr. 14S	SFMC	aReA, w, Yersinia enterocolitica	+	+
cDNS Nr. 14P	PBMC			-
cDNS Nr. 15	SFMC	aReA, m, Yersinia e.	+	+
cDNS Nr. 21	SFMC	aReA, w, Shigella s.	+	+
cDNS Nr. 22	SFMC	aReA, m, Chlamydia trachomatis	+	+
cDNS Nr. 24	SFMC	cReA, m, Erreger nicht bekannt	-	-
cDNS Nr. 7	PBMC	gesund, m	+	-
RNS PBMC EHW	PBMC	gesund, w	-	-

Erklärung: PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen; SFMC: Zellen aus Synovialflüssigkeit; aReA/cReA: akute/chronische Reaktive Arthritis; w/m: weiblich/männlich; Erreger: bakterielle Infektion vor ReA; TRBV1⁺-Klon^{ReA}: monoklonale VB1JB2.3-Verteilung in VB-CDR3-Spekatypisierung, d.h. expandierter TZR-Klon mit klontypischen β ^{ReA}-Kette;

4.1.6 Definition von sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten (Vorarbeiten)

Dieser Abschnitt beschreibt die Vorarbeiten zur Identifizierung der klontypischen α ^{ReA}-Ketten durch CDR3 α -Spektratypisierungen in der vorhergehenden Diplomarbeit (Schönwetter-Steer, 2005), um die hier angelegte Versuchsreihe und Ergebnisse verständlicher darstellen zu können. Die Definition von sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten führte zur folgenden Verwendung dieser α -Ketten und bildete die Basis der vorliegenden Arbeit.

Monoklonal expandierte TZR α -Ketten einer ReA-Patientin Nr. 006-2.5.2.1

Für die Analyse des TZR α -Ketten-Repertoires in Synovialzellen (SFMC) einer HLA-B27⁺-ReA-Patientin (Nr. 006-2.5.2.1), in denen die expandierte klontypische TZR β ^{ReA}-Kette vorlag, wurden diese SFMC auf das Vorkommen der V β 1-Kette vorsortiert und die daraus isolierte RNS für die Spektratypisierung verwendet. Die V β 1-Vorsortierung liess erwarten hauptsächlich nur die α -Ketten zu analysieren, die mit einer V β 1-Kette einen TZR ausbilden. Bei der RT-PCR der V β 1⁺ RNS 2.5.2.1 zeigte sich bereits ein eingeschränktes Repertoire aller 32 VA-CA-Genfamilien, da nur elf Familien mit unterschiedlicher Intensität amplifiziert werden konnten (VA1A, VA3, VA4B, VA7, VA8, VA12, VA18, VA20, VA22, VA23 und VA25). Nur diese elf PCR-Produkte wurden für die nachfolgende VA-CA-Spektratypisierung (siehe Abschnitt 5.1.5.3, S. 42ff) weiterverwendet, wobei bei zwei Amplifikaten von VA18 und VA22 keine Expression mehr nachgewiesen wurde. Das Ergebnis der verbliebenen neun Amplifikate in der Spektratypisierung ist im Anhang zur Verdeutlichung aufgeführt (siehe Abschnitt 9.4; Abbildung 26, S. 152).

Keine der TZR α -Ketten der VA-CA-Spektratypisierung der V β 1⁺-cDNS von SFMC einer ReA Patientin 006-2.5.2.1 zeigte eine statistisch erwartete Normalverteilung der CDR3-Längen. Jedes noch vorkommende TZR α -Kettentranskript in dieser eingeschränkten Population zeigte eine monoklonale Expansion erkennbar durch dominante Maxima. Zum Nachweis, ob ihre CDR3-Längen identisch oder ähnlich sind und ob sie monoklonal vorkommen, wurden die PCR-Produkte sequenziert. Bei der Sequenzanalyse trat jeweils eine Sequenz in der CDR3-Region auf, was die monoklonale Expansion dieser α -Ketten bestätigte. Drei rekombinierte PCR-Produkte VA1A, VA4B und VA20 bilden nicht funktionelle TZR, da die V-J-Umlagerungen jeweils zu Stoppkodons im Leseraster führen und wurden deshalb nicht weiter untersucht.

Die verbliebenen sechs monoklonalen funktionellen TZR α -Ketten wurden als TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten definiert, da jede mit der TZR β ^{ReA}-Kette assoziiert sein und ihr Vorkommen eine potentiell (auto-)aggressive Rolle bei der Reaktiven Arthritis spielen könnte. Die Nukleotid-Sequenzen mit zugehörigen Aminosäuren der CDR3-Regionen der sechs Kandidaten- α -Ketten sind in der folgenden Abbildung 3 aufgeführt.

TZR α -Ketten weiterer ReA-Patienten

Eine weitere CDR3 α -Spektratypisierung sollte Aufschluss darüber geben, ob eine ähnlich auffällig monoklonal expandierte TZR α -Kette in anderen ReA-Patienten nachweisbar war. Verwendet wurde im Labor bereits vorhandene cDNS von Synovialzellen weiterer vier ReA-Patienten, die wie unter May et al. (2002) beschrieben, auf die klontypische TZR β ^{ReA}-Kette analysiert wurden und die die VB1JB2.3-Umlagerung aufwiesen.

VA3JA28
TACTTCTGTG CTACGGAGGG ATACTCTGGG GCTGGGAGTT ACCAACTCAC TTTCGGGAAG GGGACC Y F C A T E G Y S G A G S Y Q L T F G K G T
VA7JA24.02
TACCTCTGTG CTGTGAGCTG GGGGAAATTG CAGTTTGGAG CAGGGACC Y L C A V S W G K L Q F G A G T
VA8JA7
ACTCGGCTGT TTTAACAGA CTCGCTTTTG GGAAGGGGAA C D S A V L N R L A F G K G N
VA12JA28
TACTTCTGTG CTCTGAGTGT CCTGGGGCT GGGAGTTACC AACTCACTTT CGGGAAGGG GACC Y F C A L S V P G A G S Y Q L T F G K G T
VA23JA20
TACCTCTGTG CTGTGGTCTC TAACGACTAC AAGCTCAGCT TTGGAGCCGG AACC Y L C A V V S N D Y K L S F G A G T
VA25JA52
TACTTCTGTG CTGGGCTGGG TGCTGGTGGT ACTAGCTATG GAAAGCTGAC ATTTGGACAA GGGACC Y F C A G L G A G G T S Y G K L T F G Q G T

Abbildung 3: Sequenzen der CDR3-Regionen der sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten

Alle amplifizierbaren und funktionellen α -Ketten der V β 1-sortierten SFMC der ReA-Patientin (006-2.5.2.1) lagen monoklonal expandiert vor und wurden definiert als TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten. Angegeben ist jeweils sowohl die Nukleotidsequenz mit eingeschoben N-Nukleotiden (grau markierte Insertion), als auch drunter die Aminosäuresequenz (AS) der CDR3-Region (gelb markiert) an der V-J-Verknüpfungstelle. Die CDR3-Region ist wie folgt definiert: Beginn mit 3. AS nach dem Cystein in der konservierten V-Sequenz am 3'-Ende von VA (schwarz) bis zu einer AS vor der konservierten Sequenz innerhalb der JA-Region (blau) (X entspricht beliebiger AS): Y-L/F-C-A-X-CDR3-F-G-X-G-T

Die verwendeten cDNS von SFMC/PBMC der ReA-Patienten und gesunden Spendern sind unter Abschnitt 4.1.5, S. 27 gelistet. Amplifiziert wurden nur die elf VA-Gensegmente, die zur VA-CA-Spektratypisierung der V β 1-sortierten 006-2.5.2.1. gewählt wurden und die dort ein Produkt zeigten. Das Ergebnis der relevanten sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten dieser VA-CA-Spektratypisierung weiterer Patienten ist ebenfalls im Anhang in Abbildung 27 dargestellt.

Das Repertoire der TZR α -Ketten in den anderen, nicht auf V β 1⁺ sortierten SFMC lag bei keiner untersuchten α -Ketten monoklonal expandiert vor oder zeigte die gleiche Länge wie eine der TZR α -Kandidaten-Ketten. Dieses Ergebnis lag im Rahmen der Erwartungen, da nur ein Teil der SF-T-Zellen V β 1 exprimiert. Dennoch ist eine Verschiebung der Normalverteilung zu erkennen, ein oligoklonales α -Ketten-Repertoire ist sichtbar und ein größeres Maximum weist auf eine mögliche dominante Umlagerung hin. Die nähere Sequenzanalyse der auffällig vorkommenden einzelnen Maxima bei VA7 anderer Patienten entspricht nicht der gesuchten VA7-Kandidaten-Kette von 2.5.2.1. Des Weiteren kommen die VA7-Ketten nicht monoklonal vor, sondern entsprechen einer Rekombination mit mehreren JA-Elementen der gleichen Länge, was hier als dominantes Fragment erscheint. Wie in Schönwetter-Steer (2005) beschrieben sind diese VA7-Sequenzen wahrscheinlich auf das monoklonale Vorkommen von VA7⁺ Zellen im peripheren Blut der Normalbevölkerung zurückzuführen und deutet auf die Überrepräsentation von klonalen VA7-Sequenzen auch in SF T-Zellen hin (siehe Han et al. (1999). Von besonderem Interesse erschien das Vorkommen von

dominanten Spitzen in der Spekatypisierung bei VA12 (14SF/14PB/15SF/22SF), VA23 (15SF) und VA25 (14SF/15SF), die auf gleiche Fragmentlängen wie die aus der cDNS der V β 1-sortierten Zellen hinweisen. Dieses Ergebnis diente als Grundlage für eine nähere Untersuchung dieser TZR α -Kandidaten-Ketten. Zwei oder mehrere identische CDR3-Regionen wären ein Hinweis auf die gesuchte ReA assoziierte TZR α -Kette.

4.2 Bakterien

4.2.1 Bakterienstämme

Für die Transformation mit Hitzeschock dienten die Bakterienstämme Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Chemically Competent *E. coli* bzw. Library Efficiency® DH5 α ™ Competent Cells, TOP10F' der Firma Invitrogen BV (Groningen, Niederlande) sowie die XL10-Gold Ultracompetent Cells von Stratagene (La Jolla, USA). Die Transformation mit Elektroporation erfolgte mit ElectroMAX™ DH10B™ (Invitrogen).

Bakterienstamm	Genotyp	Kompetenz
Subcloning Efficiency™ DH5 α Library Efficiency® DH5 α	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR</i> 17(<i>r_K⁻, m_K⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	>1x10 ⁶ cfu/ μ g >1x10 ⁸ cfu/ μ g
TOP10F'	F' <i>{lacI^q Tn10 (Tet^R)}</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i></i>	>1x10 ⁹ cfu/ μ g
ElectroMAX™ DH10B™	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL nupG</i></i>	>1x10 ¹⁰ cfu/ μ g
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Tet ^R Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]	>5x10 ⁹ cfu/ μ g

4.2.2 Kulturmedien für Bakterienzellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 17 mM NaCl (pH 7,5)
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM NaOH, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose (pH 7,0)
Freeze-Medium/ 2xEinfriermedium	72,3 mM K ₂ HPO ₄ , 26,5 mM KH ₂ PO ₄ , 3,1 mM Na-Citrat, 0,73 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O 13,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 8,8 % (v/v) Glycerin

Entsprechend dem anzureichernden Plasmid wurden die Selektionsantibiotika Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder Kanamycin (ICN Biomedicals, Aurora, USA) jeweils in einer Endkonzentration von 50 μ g / ml verwendet.

4.3 Eukaryotische Zellen

4.3.1 Zelllinien und Transfektanten

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle; Referenz
58 α - β -	TZR-Maus-T-Zellhybridom	PD Dr. Klaus Dornmair (Martinsried) (Letourner et al., 1989 Blank et al., 1993)
BTB/IHW9067	Humane HLA-B27 ⁺ B-Zelllinie (B-LCL)	Prof. Ekkehard Albert
COS-7	Affen Nierenfibroblastenzelllinie der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>) mit stabiler Expression des großen SV40 T-Antigens	Klaus Dornmair ATCC CRL-1651 (Gluzman, 1981)
GP+E 86	Murine ecotrope Verpackungszelllinie GP+E	Klaus Dornmair (ATCC CRL-9642)
GP+E-hCD8	Murine ecotrope Verpackungszelllinie GP+E produziert CD8 α β -Retrovirus durch Transfektion von pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β (cDNS von hCD8 α und hCD8 β mit IRES2-Sequenz verknüpft in pLPCX von Clontech)	Klaus Dornmair (Martinsried)
JM22	TZR-Transfektante 58 α - β -: Va10Ja42 ⁺ V β 17J β 2.7 ⁺ ; spezifisch für das HLA-A*0201 restringierte Peptid flu (58-66) vom Influenza Matrixprotein A	Klaus Dornmair
L929 (L-Zellen; LTK)	Maus Fibroblastenzelllinie	Klaus Dornmair ATCC CCL-1.3
LTK-A2	Maus Fibroblastenzelllinie mit HLA-A*0201 Expression	Klaus Dornmair

Im Folgenden werden die stabilen Transfektanten aufgeführt, die in Zusammenhang mit dieser Arbeit etabliert wurden:

Bezeichnung der stabilen Transfektante	Transfizierte Expressionvektoren
1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP (58-TZR-Hybridom)	VA3JA28 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β , pcDNA-NFAT-sGFP
2-V α 7-CD8-NFAT-sGFP (58-TZR-Hybridom)	VA7JA24 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β , pcDNA-NFAT-sGFP
4-V α 12-CD8-NFAT-sGFP (58-TZR-Hybridom)	VA12JA28 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β , pcDNA-NFAT-sGFP
5-V α 23-CD8-NFAT-sGFP (58-TZR-Hybridom)	VA23JA20 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β , pcDNA-NFAT-sGFP
6-V α 25-CD8-NFAT-sGFP (58-TZR-Hybridom)	VA25JA52 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β , pcDNA-NFAT-sGFP

7-V α 3-CD8 (58-TZR-Hybridom)	VA3JA28 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β
8-V α 7-CD8 (58-TZR-Hybridom)	VA7JA24 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β
10-V α 12-CD8 (58-TZR-Hybridom)	VA12JA28 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β
11-V α 23-CD8 (58-TZR-Hybridom)	VA23JA20 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β
12-V α 25-CD8 (58-TZR-Hybridom)	VA25JA52 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β
L-B27 (L929) (Petra Prinz, 2007)	pTM-B27, pUC18- β 2m
L-B7 (L929) (Petra Prinz, 2007)	pTM-B7, pUC18- β 2m
COS-B27	pTM-B27

4.3.2 Kulturmedien für eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Kulturmedium RPMI 1640 (Bio Whittaker, Verviers, Belgien)	10 % hitzeinaktiviertes FCS (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) 1 mM Natriumpyruvat (Bio Whittaker) 50 U/ml Penicillin (Bio Whittaker) 50 μ g/ml Streptomycin (Bio Whittaker) 1 % Non Essential Amino Acids (Bio Whittaker)	
Kulturmedium DMEM (Bio Whittaker)	10 % hitzeinaktiviertes FCS 1 mM Natriumpyruvat 50 U/ml Penicillin 50 μ g/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin (Bio Whittaker)	
Selektionsmedium für L929-pTM-Transfektanten	Kulturmedium DMEM	0,4 mg/ml G418 (PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich)
Selektionsmedium für COS-B27-Transfektanten	Kulturmedium RPMI 1640	1 mg/ml G418
Doppel-Selektionsmedium für TZR-Transfektanten	Kulturmedium RPMI 1640	2,5/2,25/2,0 mg/ml G418 bzw. 1,5 mg/ml G418 zum Selektionserhalt und 0,3 bzw. 0,4 mg/ml Hygromycin (PAA Laboratories GmbH)
Dreifach-Selektionsmedium für TZR-Transfektanten transduziert mit hCD8- Retrovirus	Kulturmedium RPMI1640	1,5 mg/ml G418, 0,3 mg/ml Hygromycin und 1 μ g/ml Puromycin (PAA Laboratories GmbH)
Vierfach-Selektionsmedium für CD8 ⁺ TZR-Transfektanten transfiziert mit pcDNA- NFAT-sGFP	Kulturmedium RPMI1640	1,5 mg/ml G418, 0,3 mg/ml Hygromycin und 1 μ g/ml Puromycin 6/4,5/3 μ g/ml Blastidicin bzw. 3 μ g/ml Blastidicin zum Selektionserhalt (PAA Laboratories GmbH)
Einfriermedium	90 % hitzeinaktiviertes FCS 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck AG, Darmstadt, Deutschland)	

4.4 Enzyme, Antikörper und Peptide

Restriktionsenzyme

Zur Restriktion von DNS wurden Restriktionsendonukleasen von New England BioLabs (Beverly, USA), Eurogentec GmbH (Köln, Deutschland), oder Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Spaltung erfolgte jeweils mit den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen und BSA unter den empfohlenen Reaktionsbedingungen.

Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/μl)	PE-Applied Biosystems, Foster City, USA
RNase A (5 U/μl)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Quick-T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	New England BioLabs, Beverly, USA
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
Trypsin (25 mg/ml)	PAA, Pasching Österreich

Antikörper

Klon	Spezifität und Markierung	Isotyp und Herkunft	Hersteller / Bezug über Referenzen
Primärantikörper			
145-2C11	Maus-CD3ε-FITC	IgG1 Hamster	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland (Leo et al., 1986)
2A5	human β ₂ -Mikroglobulin	IgG2a Maus	J. Johnson, Institut für Immunologie, LMU München, Deutschland
2ST8.5H7	human CD8β	IgG2a Maus	Beckman Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland
BBM.1	human β ₂ -Mikroglobulin	IgG2b Maus	ATCC HB28 (Brodsky et al., 1979)
BL37.2	human-TZR-Vβ1	IgG1 Ratte	Beckman Coulter Immunotech
ME1	HLA-B27 / B7	IgG1 Maus	Ellis et al., 1982
TM1	HLA B27	IgG2b Maus	Thurau et al., 1989
W6/32	HLA Klasse I α-Ketten mit β ₂ -Mikroglobulin	IgG2a Maus	ATCC HB95 (Barnstable et al., 1978; Parham et al., 1979)
Isotypkontrollen			
MOP 141	IgG2b Isotypkontrolle	IgG2b Maus	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
MOP C21	IgG1 Isotypkontrolle	IgG1 Maus	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
UPC10	IgG2a Isotypkontrolle	IgG2a Maus	ICN, Biomedicals, Eschwege, Deutschland

Klon	Spezifität und Markierung	Isotyp und Herkunft	Hersteller / Bezug über Referenzen
Sekundäre Antikörper			
Star80F	anti-Ratte-IgG-FITC	Ziege	Serotec GmbH, Oxford, England
	anti-Ratte-DTAF	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
	anti-Ratte-Alexa488	Huhn	Molecular Probes, Eugene, USA
	anti-Maus-Alexa488	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
	anti-Maus-PE	Ziege	Immunotech SA, Marseille, Frankreich

Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Herkunft / Bezug / Referenz
Aggrecan #67	SRHHAFCFR	Aggrecanprotein Aminosäuren 667 bis 675 / Dr. Wolfgang Kuon (München) / Wolfgang Kuon et al., 2004
flu (58-66)	GILGVFVTL	Influenzamatrixprotein Aminosäuren 58 bis 66, HLA-A*0201 Restriktion / Klaus Dornmair / Zugriffsnummer V01099

4.5 Kits und spezielle Reagenzien

Produktbezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland	Gelelektrophorese
Agarose SeaKem GTG	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland	Gelelektrophorese
dNTP Set PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	PCR
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Nukleinsäuredetektion
FastStart High Fidelity PCR Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	PCR
FuGENE® HD	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	Transfektion
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Reinigung von PCR-Produkten
iProof™ High Fidelity DNA Polymerase	BioRad, München, Deutschland	PCR
Lipofectamine 2000	Invitrogen, BV, Groningen, Niederlande	Transfektion
Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA	IL-2 ELISA
NucleoSpin® Extract/NucleoTrap®-Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Reinigung von DNS
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Plasmidisolierung
QIAGEN Plasmid Maxi	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Plasmidisolierung
QIAGEN One-Step-RT-PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Einzelzell-RT-PCR

Produktbezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande	PCR
pcDNA™3.1 Directional TOPO®Expression Kit	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande	Gerichtete Klonierung
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Durchflusszytometrie
QuickLigation™ Kit	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland	Ligation
QuikChange®II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA	Nukleotidaustausch
SUPERSCRIPT™II Reverse Transkriptase	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande	cDNS-Synthese
TOPO TA Cloning®	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande	Klonierung PCR-Produkten
Trypanblau	Cambrex, Verviers, Belgien	Farbstoff toter Zellen

4.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acrylamid-Bisacrylamid 30 % (29:1)	29 g Acrylamid und 1 g Bisacrylamid ad 100 ml mit H ₂ O
6x Auftragspuffer für Agarosegelelektrophorese	10 mM Tris/ HCl pH 8,2 2 mM EDTA 30 % (v/v) Ficoll 4000, pH 8,0 4 % (w/v) Orange G
DEPC-behandeltes Wasser	0,1 % DEPC wird in Wasser gelöst, für 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert. RNS wurde immer in DEPC behandeltem Wasser gelöst.
GTE-Puffer	50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
PBS pH 7,4	139,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
1x TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA 0,015 % (v/v) Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
1x TBE-Puffer	100 mM Tris 83 mM Borsäure 10 mM EDTA 0,015 % (v/v) Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1 mM EDTA

4.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Gene Pulser® Cuvette (0,4 cm, 0,2 cm und 0,1 cm electrode gap)	Bio Rad, Hercules, USA oder PeqLab, Erlangen Deutschland
Maxisorb- 96 well Flachbodenplatten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Falcon-Röhrchen, Plastikpipetten, Pipettenspitzen, TC- Kulturflaschen, 6- und 24-Loch-Flachbodenplatten, 96- Loch Rund- und Flachbodenplatten, Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Fotometerküvette Uvette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml) und PCR Gefäße (200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

4.8 Geräte

Gerät: Bezeichnung; Hersteller
Begasungsbrutschrank: BB 6220; Kendro, Langenselbold, Deutschland
Durchflusszytometer: FACS Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektroporationssysteme: Gene Pulser™; Bio Rad, Hercules, USA; Electro Cell Manipulator 600, BTX, San Diego, USA
ELISA-Lesegerät: E ^{max} precision microplate reader; MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Fotometer: BioPhotometer; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationssystem: Biophotonics; Ann Arbor, USA
Mikromanipulator: LN25 Mini; Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland
Mikroskop (Durchlicht): ID 03; Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop (Fluoreszenz): TE 2000 S Eclipse; Nikon, Amstelveen, Niederlande
Mikroskop (Fluoreszenz): AxioVert 200M; Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Schüttelinkubator: TH25/SM25; Edmund Bühler Labortechnik, Tübingen, Deutschland
Sequenzierer: ALFexpress™ DNA sequencer oder MegaBACE™ 1000; Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, Deutschland
Sterilwerkbank: HeraSafe; Kendro, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler: GeneAmp9600; Perkin Elmer, USA; Omn-E Hybaid; MWG –Biotech, Ebersberg, Deutschland; Mastercycler; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Techne Progene; Thermo-Dux, Wertheim, Deutschland
Transilluminator: UV-Transilluminator (Wellenlänge 312 nm); Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Zählkammer: Neubauer, 0,1 mm Tiefe; Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön, Deutschland
Zentrifugen: 4K15; Sigma, Osterode am Harz, Deutschland Biofuge fresco, Biofuge pico, Megafuge 1.0 R und Suprafuge 2.0; Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland Avanti J – 30 und Optima MAX-XP; Beckman Coulter, Fullerton, USA

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen

Plasmid-DNS-Isolierung mittels NucleoSpin® Plasmid Kit

Zur Plasmidisolierung wurden 5 – 7 ml einer Übernachtskultur eingesetzt und nach Anleitung des Herstellers mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit vorgegangen.

Schnelle Plasmidisolierung nach Chowdhury, 1991 („one step miniprep method“)

Zur raschen Überprüfung einer größeren Anzahl von Transformanten auf erfolgreiche Insertion mittels Restriktionsanalyse wurde diese Methode der Plasmidisolierung, auch Phenolminipräparation genannt, durchgeführt. 500 µl einer Übernachtskultur wurden mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (IAA) (25:24:1)-Lösung versetzt, 1 min auf dem Vortexschüttler kräftig gemischt und 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol gründlich gemischt. Die gefällte DNS wurde sofort 5 min bei 12000 g in der Mikroliterzentrifuge sedimentiert. Das DNS-Präzipitat wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TER (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 20 mg/ml RNase A) gelöst. 5 - 10 µl des gelösten Plasmids wurden in einen geeigneten Restriktionsverdau für max. 1 h eingesetzt.

„PEG“-Plasmidisolierung/Modifizierte Alkalische Lyse

Die Bakterienzellen einer 50-ml-Übernachtskultur wurden 10 min bei 6000 g und 8°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 2 ml GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 3 ml frisch zubereiteter 0,2 N NaOH/1 % SDS-Lösung und vorsichtiges Kippen, bis die trübe Bakteriensuspension klar und zähflüssig wurde. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Durch Zugabe von 3 ml 3 M K-Acetat (pH 4,8) wurde das Lysat neutralisiert. Durch Kippen wurde gemischt und für 5 min auf Eis gekühlt. Es folgte für 10 min eine Zentrifugation bei 6000 g. Der Überstand mit Plasmid-DNS wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 20 µl RNase A (Endkonzentration 20 µg/ml) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Bei der folgenden zweimaligen Chloroform-Extraktion wurden 4 ml Chloroform (p.a.) zugegeben, 30 s mit der Hand gemischt und dann für 1 min bei 6000 g zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und es folgte die Präzipitation der DNS durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol (p.a.) und 10 min Zentrifugation bei 6000 g. Das Sediment wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet, in 320 µl Wasser gelöst und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 80 µl 4 M NaCl und 400 µl 13 % PEG₈₀₀₀. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Mit der folgenden Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12000 g wurde die präzipitierte Plasmid-DNS sedimentiert. Das Sediment wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Die getrocknete Plasmid-DNS wurde in 300 µl Tris/HCl pH 8,5 steril gelöst und ihre Konzentration bestimmt.

Plasmid-DNS-Isolierung mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit

Zur Isolierung besonders großer reiner Plasmidmengen, die zur Transfektion benötigt wurden, wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Dabei wurden für eine Bakterien-Vorkultur 2 ml LB/Amp-Medium mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 6 - 8 Stunden bei 37°C geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 500 ml LB/Amp-Medium mit der Vorkultur versetzt und 16 Stunden bei 37°C geschüttelt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Protokoll des Herstellers und die Zentrifugationsschritte in der Suprafuge 2.0. Mit Hilfe des Fotometers wurde anschließend die DNS-Konzentration bestimmt.

5.1.2 Reverse Transkription

Das hierbei angewandte Prinzip der cDNS-Synthese mit Hilfe des RT-PCR Kits SUPERSCRIPT™ II von Invitrogen beruht darauf, dass mit wenigen Ausnahmen fast alle eukaryotischen mRNA-Moleküle polyadenyliert sind. Die Synthese der cDNS geht dabei von einem Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer aus, der in der Lage ist, sich an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA anzulagern. Dafür wurden 1 ng – 5 µg Gesamt-RNS eingesetzt und genau nach Angaben des Herstellers vorgegangen. 1 - 2 µl der so erzeugten cDNS wurde in eine PCR für weitere Analysen eingesetzt.

5.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren und Präzipitation

Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Um organische Verunreinigungen, die bei weiteren enzymatischen Reaktionen von DNS stören können, aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) gründlich gemischt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 g bleiben die durch das Phenol denaturierten Proteine in der unteren organischen Phase oder bilden eine Interphase.

Die obere wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde zur Entfernung von Phenolresten einer Chloroformextraktion unterzogen. Dafür wurde 1 Vol. Chloroform (p.a.) zugegeben, gut geschüttelt, anschließend 10 min bei 12000 g zentrifugiert und wieder die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Danach folgte die Präzipitation der Nukleinsäuren.

Reinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte von überschüssigen Primern, Puffer oder Taq-Polymerase zu reinigen, wurde der High Pure PCR Product Purification Kit verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Präparation von DNS-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung

Für die Isolierung von Restriktionsfragmenten wurde der gesamte Restriktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei einem präparativen Gel wurde wie unter Agarosegelelektrophorese Absatz 5.1.4 verfahren, jedoch mit der Agarose Seakem GTG gelöst in Puffer 1x TAE und als Laufpuffer 1 x TAE-Puffer.

Die betreffende Bande wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten. Für die folgende Aufreinigung wurde der NucleoTrap®-Kit oder der NucleoExtract®-Kit verwendet, wobei nach Angaben des Herstellers vorgegangen wurde.

Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Fällung von DNS aus vorgereinigten Überständen wurde entweder Natriumchlorid in einer Endkonzentration von 150 mM – 200 mM oder 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat sowie das 2,5-fache Vol 100 % Ethanol zugegeben und gut gemischt. Die Fällung wird durch das leicht saure Milieu beschleunigt und wurde entweder mindestens 1 Stunde bei -80°C oder über Nacht bei -20°C durchgeführt. Anschließend wurde die DNS bei 12000 g für 15 Minuten sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal zur Entfernung der Salze mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer (für sterile DNS-Lösung unter einer Sterilwerkbank) gelöst.

5.1.4 Analyse von Nukleinsäuren

Analyse mit Agarosegelelektrophorese

Je kleiner die aufzutrennenden Fragmente sind, desto höher muss das Agarosegel konzentriert sein oder es muss ein Polyacrylamidgel benutzt werden. Es wurden Konzentrationen von 0,7 % - 2,0 % in 1x TBE- Puffer (versetzt mit 0,15 µg/ml Ethidium-bromid) gewählt. Die DNS-Proben wurden mit Wasser auf ein Volumen von 10 – 20 µl gebracht und mit 6x Auftragspuffer versetzt. Der Größenvergleich der DNS-Fragmente geschah durch den zusätzlichen Auftrag von 200 ng DNS-Marker (1kb Plus). Die Spannung wurde abhängig von der Fragmentgröße und der Prozentigkeit des Gels zwischen 30 und 100 Volt gewählt. Das Gel wurde anschließend mit dem Geldokumentationssystem fotografiert.

Konzentrationsbestimmung mit Spektrofotometrie

Vor der Konzentrationsbestimmung wurde die Nukleinsäure vollständig gelöst und mit Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt (bei niedrigen Konzentrationen 3:97). Die Messung erfolgte in Quarzküvetten bei 260 nm gegen Wasser als Nullwert.

Konzentrationsabschätzung nach gelelektrophoretischer Auftrennung

Bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen und Volumina wurde die Menge über ein Agarosegel abgeschätzt. Die Orientierung erlaubt der 1 kb Plus-Längenstandard, von dem die DNS-Menge pro Bande bekannt ist.

Sequenzierung von DNS

Für eine Sequenzierung wurden PCR-Produkte gereinigt und die Menge auf einem Agarosegel abgeschätzt. Anschließend wurden 20 ng DNS/100 bp des PCR-Produkts oder 1 µg gereinigte Plasmid-DNS getrocknet. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) oder vom Sequenzierservice der Genetik des LMU Biozentrums unter Angabe eines geeigneten Sequenzierungsprimers durchgeführt.

5.1.5 Amplifikation von DNS-Sequenzen mit PCR und RT-PCR

Durch eine geeignete Auswahl beidseitig flankierender sequenzspezifischer Oligonukleotid-Paare wurden Zielsequenzen von DNS- bzw. cDNS-Abschnitten in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Saiki et al., 1988). Bei der Reversen-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde zuerst RNS in cDNS (siehe Abschnitt 5.1.2) revers transkribiert und die cDNS in eine Amplifikation eingesetzt. Für die Wahl der Oligonukleotide wurde beachtet, dass sie insbesondere am 3'-Ende keine Sekundärstrukturen bilden, nur an einer DNS-Sequenz binden können und dass die Anlagerungstemperatur beider Primer ähnlich ist (oder die niedrigere der beiden wurde eingesetzt). Die Anlagerungstemperatur T_A für Oligonukleotide an DNS wurde in der Regel 3°C unterhalb der von der Firma MWG-Biotech angegebenen Schmelztemperatur gewählt.

Zum PCR-Ansatz wurden die spezifischen Primer mit entweder je 5 ng Plasmid-DNS, 2 ng PCR-Produkt oder 1 - 2 µl cDNS (bei der TRAV-Amplifikation 1:3 verdünnt mit H₂O) auf Eis pipettiert. Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde mit der Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 5.1.4) überprüft.

5.1.5.1 RT-PCR für die TRVB1- und TZR-LVA-Amplifikationen

Zur Amplifikation der rekombinierten TZR-VB1-Kette- und LVA-Ketten-Sequenzen wurde, wenn nicht anders angegeben, der folgende PCR-Ansatz standardmäßig verwendet und die darauf folgenden PCR-Bedingungen gewählt.

Standardansatz der PCR für verschiedene TRBV1-Amplifikationen und LVA-TZR

Reagenz	Stock-Konzentration	End-Konzentration	Volumen
10x PCR-Puffer	677 mM Tris/HCl (pH 8,8) 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 % Tween 20	67,7 mM Tris/HCl (pH 8,8) 16,6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,01 % Tween 20	2 µl
dNTP	2 mM	0,2 mM	2 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
5'-Primer	10 µM	0,5 µM	1 µl
3'-Primer	10 µM	0,5 µM	1 µl
cDNS	-	-	1 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,25 U/ µl	0,1 µl
H ₂ O	-	-	ad 20 µl

PCR-Bedingungen der Standard-PCR von TRBV1

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	35
Anlagerung	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Endextension	72°C	10 min	1

Bei der Herstellung der Vollelängesequenzen für die TZR α -Kandidaten TRAVL-TCRAC wurde der Standard-PCR-Ansatz mit zusätzlich 0,5 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid) und mit der FastStart High Fidelity Taq-Polymerase (Roche) verwendet, die mit einer Korrekturlesefunktion ausgestattet ist. Die PCR-Bedingungen hierfür sind im Folgenden aufgelistet.

PCR-Bedingungen zur Amplifikation der vollen Länge cDNS von TRAV-Ketten

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	4
Anlagerung	60°C	30 sec	
Extension	72°C	40 sec	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Anlagerung	65°C	30 sec	30
Extension	72°C	40 sec	
Endextension	72°C	10 min	

5.1.5.2 Mutagenese-PCR

Um Nukleotidsequenzen gezielt in vitro zu verändern, wurde die PCR-Reaktion verwendet. Eingesetzt wurden Oligonukleotide, die zur Sequenz größtenteils komplementär waren. Im verändernden Bereich enthielten sie Nukleotidsequenzen, die von der bestehenden DNS-Sequenz abwichen. So wurde gezielt die erwünschte Sequenz der klonotypischen TZR β ^{ReA}-Kette erhalten. Außerdem wurde vom Vektor RSV5hygro die enthaltene LVAJA-Sequenz entfernt, was in dem Vektor RSV5hygro_leer resultierte zur Erleichterung der Klonierung anderer LVAJA-Sequenzen. Für Primer, die nicht vollständig an die DNS binden, wurden für die Berechnung der Anlagerungstemperatur nur die komplementären Basen einbezogen. In diesem Fall wurden ca. 4 Vorzyklen mit der so ermittelten Anlagerungstemperatur durchgeführt. Im weiteren Verlauf der PCR wurde die Anlagerungstemperatur entsprechend der vollen Komplementarität verwendet.

War es nötig einzelne Nukleotide auszutauschen wurde der QuikChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene genau nach Anleitung mit 10 ng Plasmid-DNS und unten angeführten Bedingungen verwendet. Wie beim Einfügen einer stillen Mutation in die *Pvu* II-Schnittstellen (CAGCTG) innerhalb der LVA-Sequenz von LVA8JA7, LVA23JA20 und zweimal in LVA25JA52 im Vektor pCRII. Dafür wurde eine zueinander komplementäre Primerkombination kreiert, in deren Mitte der Nukleotidaustausch ohne Veränderung des Leserasters eingefügt wurde (siehe Sequenz im Abschnitt 4.1.3). Die veränderte Plasmid-DNS wurde in XL10-Gold ultrakompetente Bakterien transformiert, die Kolonien mit einer PCR untersucht (siehe Abschnitt 5.2.2 und 5.2.3) und die isolierte Plasmid-DNS sequenziert.

PCR-Bedingungen zur Mutagenese mit QuikChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95°C	1 min	1
Denaturierung	95°C	50 sec	18
Anlagerung	60°C	50 sec	
Extension	68°C	4 min	
Endextension	68°C	7 min	1

5.1.5.3 Semi-nested RT-PCR zur CDR3-Spektroskopie der TZR α -Kette

Die Unterscheidung zwischen VA-CA- oder VA-JA-CDR3-Spektroskopie der TZR α -Ketten wird in der schematischen Abbildung 4 verdeutlicht.

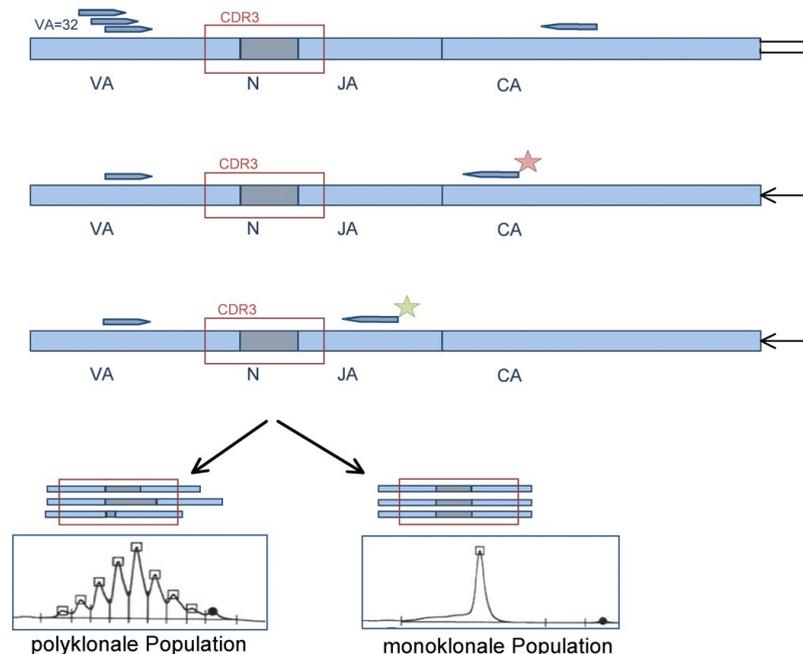


Abbildung 4: Schema der CDR3-Spektroskopie der TZR α -Ketten

In einer ersten Reaktion wurde eine RT-PCR zur Amplifikation aller 32 VA-Gensegmente durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde entweder in eine semi-nested PCR mit einem fluoreszenzmarkierten CA-Primer (VA-CA-Spektroskopie) oder mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten JA-Primern (VA-JA-Spektroskopie) eingesetzt und die Fragmente in der CDR3-Spektroskopie analysiert. Die Primerbindestellen an der cDNS von VA-CA-Transkripten sind jeweils darüber als Pfeil gekennzeichnet. Die Nukleotidlängenunterschiede der Fragmente hervorgerufen durch unterschiedliche CDR3-Regionen innerhalb eines Amplifikats wurden in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und anhand der Fluoreszenzmarkierung detektiert. Die Fragmentanalyse zeigt eine Gauß'sche Normalverteilung bei einer polyklonalen Population und ein definiertes einzelnes Maximum bei einer monoklonalen Population, was auf eine klonale Expansion einer TZR α -Kette hindeuten könnte.

VA-CA-CDR3-Spektroskopie

Die Gensequenzen aller vorhandenen rearrangierten TZR α -Ketten in der rekombinierten cDNS wurden für die VA-CA-Spektroskopie amplifiziert. Die 32 TRAV-Genfamilien wurden jeweils mit einem 5'-VA-Primer und dem 3'-Primer TCA4 in der CA-Region mit Hilfe einer RT-PCR amplifiziert (1. PCR). Der Ansatz und die PCR-Bedingungen wurden nach Han et al. (1999) verwendet und sind auf folgender Seite angeführt. Die veröffentlichten Sequenzen der 5'-Primer in den TRAV-Regionen (VA-Primer), befinden sich im Anhang Abschnitt 9.2. Die folgende Abbildung 5 zeigt die Primerbindestellen an der cDNS detaillierter. Es wurde jeweils die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (PE-Applied Biosystems, Foster City, USA) mit Korrekturlesefunktion verwendet.

Die Amplifikate wurden in eine semi-nested PCR mit einem fluoreszenzmarkierten Primer TCRAC-Cy5, der weiter strangaufwärts in der CA-Region bindet eingesetzt (2. PCR). Die Fragmente wurden auf einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Laser des automatischen Sequenziergerätes ALFexpress™ DNA sequencer sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 5.1.8). Die Fragment-Analyse detektiert die Längenunterschiede der verschiedenen CDR3-Regionen innerhalb eines Amplifikats.

VA-JA-CDR3-Spektrotypisierung

Zur näheren Eingrenzung spezifisch auf die CDR3-Regionen der sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten wurde eine VA-JA-Spektrotypisierung durchgeführt. Dafür wurden die Primerpaare VA-JA verwendet. Der 5'-Primer im VA-Element blieb gleich und die 3'-Primer waren die fluoreszenzmarkierten JA-Oligonukleotide, die spezifisch in den gesuchten JA-Elementen binden (JAreV-FAM bzw. JAreV-TET). Als Matrize wurden die ursprünglichen Amplifikate (VA-CA) in die semi-nested-PCR eingesetzt (3. PCR). Die VA-JA-Amplifikate wurden am Sequenzierer MegaBACE™ 1000 detektiert (siehe Abschnitt 5.1.8).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bindestellen der Oligonukleotide an der cDNS der umgelagerten TZR α -Ketten für die semi-nested PCR zur CDR3-Spektrotypisierung

Die erste PCR wurde mit dem Primerpaar 5'-VA-Primer und TCA4 durchgeführt. Damit die amplifizierten VA-CA-Sequenzen in die CDR3-Spektrotypisierung eingesetzt werden konnten, wurde in einer zweiten PCR-Runde das PCR-Produkt mit einem fluoreszierenden 3'-Primer TCRAC-Cy5 nochmals amplifiziert, wobei der spezifische 5'-VA-Primer der ersten Reaktion beibehalten wurde. TCRAC-Cy5 bindet 110 bp strangaufwärts am 3'-Ende des Produkts. Für die spezifische VA-JA-Spektrotypisierung folgte eine semi-nested PCR mit verschiedenen fluoreszierenden 3'-JA-Primer (3. PCR).

Ansätze der semi-nested RT-PCR zur Amplifikation der TRAV-Gensegmente

Reagenz	Stock-Konzentration	End-Konzentration	1. PCR Menge (μ l)	2. & 3. PCR Menge (μ l)
10x PCR-Puffer	10x	1x	5	2
dNTP	je 10 mM	je 1 mM	5	2
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3	1,2
5'-Primer	10 μ M	1 μ M	5	2
3'-Primer	10 μ M	1 μ M	5	2
1. cDNS(1:3 verdünnt) bzw. 2. PCR-Produkt von 1.	-	-	1	1
Ampli-Taq-Gold-Polymerase	5 U/ μ l	1 U/50 μ l 0,5 U/20 μ l	0,2	0,1
H ₂ O	-	-	ad 50	ad 20

Bedingungen der semi-nested-RT-PCR zur Amplifikation der TRAV-Gensegmente

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen: 1. PCR	Zyklen: 2. & 3. PCR
Anfangsdenaturierung	95°C	12 min	1	1
Denaturierung	95°C	30 sec	35	25
Anlagerung	60°C	45 sec		
Extension	72°C	90 sec		
Endextension	72°C	10 min	1	1

Zur Sequenzanalyse der VA-JA-Amplifikate nach der VA-JA-Spektratypisierung wurden sie aus cDNS der verschiedenen ReA-Patienten in den Subklonierungsvektor pCR II kloniert. Dafür wurden die semi-nested PCR jeweils mit den unmarkierten JAreV-Primer (identische Sequenzen zu den TET/FAM-markierten 3'-JAreV-Primer) durchgeführt und der FastStart High Fidelity PCR Kit von Roche verwendet. Jeweils 2 µl der VA-CA-Amplifikate wurden in die VA-JA-Amplifikation eingesetzt. Der PCR-Ansatz und Bedingungen entsprechen denen der oben genannten 3. PCR, wobei die Zyklenzahl auf 40 erhöht wurde.

5.1.5.4 Mehrstufen-PCR zur Amplifikation der TZR α - und β -Kette in Einzelzellen

Bei Einzelzellen können die gepaarten α - und β -Ketten des TZR identifiziert werden. Es wurde eine Mehrstufen-PCR etabliert, die es ermöglicht alle theoretisch möglichen 32 VA-Gensegmentfamilien sowie die VB1-Kette bei geringer RNS-Menge einer potentiell einzelnen Zelle zu amplifizieren, um die entsprechende α -Kette aufzudecken.

Die folgende Abbildung 6 zeigt schematisch die Oligonukleotid-Bindestellen der aufeinander folgenden Reaktionen. Nur die Zellen die nach der Amplifikation positiv für die klontypische Umlagerung VB1JB2.3 der β -Kette waren, wurden auf ihre TZR α -Ketten untersucht. Zur Erhöhung der Spezifität wurden in jeweils drei aufeinander folgenden Schritten die Amplifikationen mit nested-PCR durchgeführt.

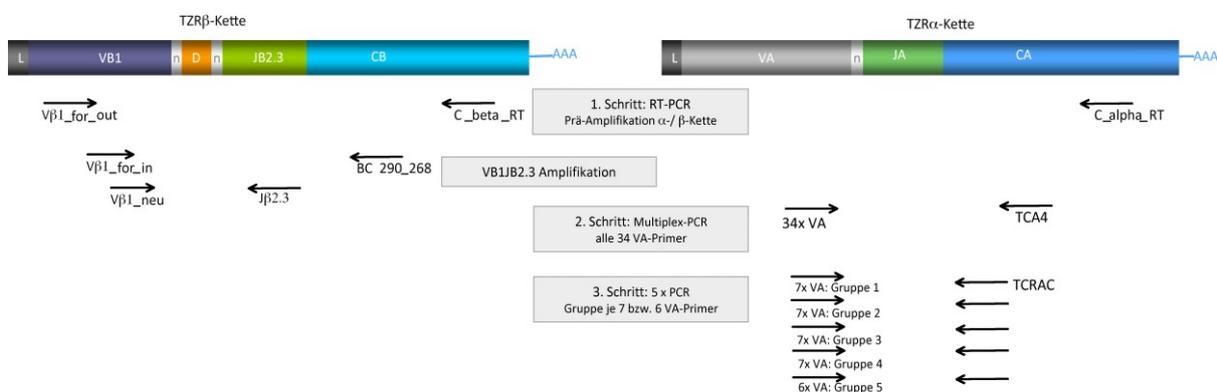


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bindestellen der Oligonukleotide der Mehrstufen-PCR zur Amplifikation der gepaarten TZR α - und β -Kette einer Einzelzelle

Dargestellt sind die Lokalisationen der jeweiligen Primerpaare der einzelnen drei Schritte bei der Mehrstufen-PCR zum Erhalt der cDNS der gepaarten TZR α - mit V β 1-Kette. Falls das VB1JB2.3-Fragment nachgewiesen wurde, erfolgten Schritt 2. und 3. zur Identifikation der α -Kette.

Um die sehr sensitive RNS einer Einzelzelle zu analysieren, wurde in dieser Versuchsreihe in einem DNS-Reinraum mit jeglichen Vorsichtsmaßnahmen vor Verlust oder Kontamination der Proben gearbeitet. Die ersten Schritte der VB1JB2.3 Amplifikation erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von P. Prinz und wurden in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der α -Kette weiterverwendet. Die einzelnen Synovialzellen der Patientin 006-2.5.2.1 waren schon im Labor vorhanden und bei -80°C abgelegt worden (Sarah Kubis).

1. Schritt: RT-PCR zur Prä-Amplifikation aller VACA-Transkripte und Amplifikation der spezifischen klontypischen VB1JB2.3-Kette

Mit Hilfe des Qiagen® OneStep RT-PCR-Kit erfolgte die cDNS-Synthese und die anschließende Prä-Amplifikation in einem Schritt. 1 μl der eingefrorenen Einzelzell-Suspension wurden in 5 μl 5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer aufgenommen und in einem PCR-Ansatz mit 2 mM dNTP, RNase Inhibitor (5U), 1 μl Qiagen OneStep RT-PCR Enzymmix, den drei Primern C_alpha_RT, C_beta_RT und V β 1_for_out (Endkonzentration 0,6 μM) auf ein Endvolumen von 25 μl mit RNase-freies Wasser gebracht.

Bedingungen der cDNS-Synthese und Prä-Amplifikation der VB1CB-Kette und VACA-Kette

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Reverse Transkription	50°C	30 min	1
Anfangsdenaturierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	35
Anlagerung	57°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Endextension	72°C	10 min	1

Die Analyse der Zellen auf VB1JB2.3 erfolgte mit zwei aufeinander folgenden nested-PCR mit dem Primerpaar V β 1_for_in/BC290-268 (und anschließend mit V β 1_neu/J β 2.3, die jeweils weiter innen liegend binden). In die Amplifikationen mit einem Standard-PCR-Ansatz (siehe Abschnitt 5.1.5.1) wurden jeweils 2 μl des vorhergehenden PCR -Produkts als Matrize eingesetzt, wobei die Bedingungen der oben dargestellten außer der Anlagerung bei 60°C entsprachen.

2. Schritt: Multiplex-PCR zur Amplifikation aller 32 AV-Gensegmente

Zum Nachweis, welche α -Kette mit der klontypischen β^{ReA} -Kette paart, wurde eine so genannte Multiplex-PCR durchgeführt. Die Amplifikation der α -Kette aller theoretisch möglichen VA-Genfamilien erfolgte mit neun Einzelzellen, deren VB1JB2.3-PCR-Produkt nachweisbar war. Je 2 μl der Prä-Amplifikationen wurde in eine PCR mit allen 34 5'-VA-Primern (eingeteilt in 32 TRAV-Gensegmentfamilien, Primersequenzen im Anhang 9.2; nach Han et al. 1999) eingesetzt. Der PCR-Ansatz sowie die jeweiligen Bedingungen sind unten angeführt.

3. Schritt: semi-nested PCR zur Analyse der gepaarten α -Kette

Zur Erhöhung der Spezifität wurde das Amplifikat mit der Vielzahl an 5'-VA-Primer vom 2. Schritt jeweils in fünf verschiedene PCR-Reaktionen eingesetzt (je 2 μ l), in denen jeweils 7 bzw. 6 VA-Primer gruppiert wurden. Dabei wurden die verschiedenen Oligonukleotide in einer Gruppe so gewählt, dass sie anhand der unterschiedlichen Fragmentgrößen unterscheidbar sind. Die Primer wurden wie folgt zusammengestellt: Gruppe 1 (VA1B, VA2, VA5, VA6, VA13, VA16, VA17); Gruppe 2 (VA1A, VA9, VA15, VA20, VA21, VA22, VA26); Gruppe 3 (VA4A, VA4B, VA10, VA18, VA19, VA24, VA30); Gruppe 4 (VA11, VA14, VA27, VA28, VA29, VA31, VA32); Gruppe 5 (VA3, VA7, VA8, VA12, VA23, VA25). Der PCR-Ansatz und die Bedingungen sind unten angeführt.

Multiplex-PCR Ansatz für 2. und 3. Schritt bei der Amplifikation der α -Kette einer Einzelzelle

Reagenz	Stock-Konzentration	End-Konzentration	2. PCR Menge (μ l)	3. PCR Menge (μ l)
10x PCR-Puffer	10x	1x	5	2
dNTP	je 10 mM	je 1 mM	5	2
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3	1,2
2. PCR: alle 5'-VA-Primer: 34 x	5 μ M	je 0,062 μ M	21,08 (je 0,62)	-
3. PCR: 5'-VA-Primer-Gruppe: 7x bzw. 6x	10 μ M	je 0,5 μ M	-	7 bzw. 6 (je 1)
2. PCR: 3'-Primer: TCA4	10 μ M	0,6 μ M	3	-
3. PCR: 3'-Primer: TCRAC	10 μ M	0,5 μ M	-	1
2. Amplifikat v. 1. Schritt bzw. 3. Amplifikat v. 2. Schritt	-	-	2	2
Taq- Polymerase	5 U/ μ l	1 U	0,2	0,2
H ₂ O	-	-	ad 50	ad 20

PCR-Bedingungen der Mehrstufen-Einzelzell-PCR bei 2. und 3. Schritt

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95°C	12 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	50
Anlagerung	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Endextension	72°C	10 min	1

5.1.5.5 Einzelzell-PCR zur Amplifikation des Plasmid-kodierten Antigens

Nach der Isolierung einer einzelnen Plasmid-kodierten Antigen tragenden COS-B27-Zelle durch Mikromanipulation (siehe Abschnitt 5.4.3.1) in ein PCR-Gefäß mit 7 μ l Wasser, wurde sofort eine Einzelzell-PCR zur Amplifikation des Plasmid-kodierten Antigens durchgeführt. Als Primerkombination diente pcDNA2nd-for-TOPO gegen pcDNA-rev3 (Endkonzentration von je 0,5 μ M) und der PCR-Ansatz wurde mit dem iProof HF Master Mix von Bio Rad (iProofTM High Fidelity DNA Polymerase) mit einer Taq-Poylmerase mit Korrekturlesefunktion durchgeführt (Endvolumen von 100 μ l oder 20 μ l). Die PCR-Bedingungen sind unten aufgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend gereinigt und in pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO Vektor gerichtet einkloniert (siehe Abschnitt 5.1.6).

PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Plasmid-kodierten Antigens

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	98°C	3 min	1
Denaturierung	98°C	20 sec	40
Anlagerung	56°C	20 sec	
Extension	72°C	20 sec	
Endextension	72°C	10 min	1

5.1.6 Klonierung von PCR-ProduktenKlonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit in den pCR[®]2.1- oder pCR[®]II-Vektor. Dieser Ansatz beruht auf der Tatsache, dass die Taq-Polymerase eine Matrizen-unabhängige Transferaseaktivität besitzt, die es ihr ermöglicht ein Desoxy-adenosinnukleotid an das 3'-OH-Ende der PCR-Produkte anzuhängen. Diese Überhänge können mit Hilfe der Topoisomerase I mit einem Deoxythymidin-Überhang am 3'-Ende des linearisierten Klonierungsvektors ligiert werden.

Die Klonierung wurde genau nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Gerichtete TOPO Klonierung in den pcDNA[™]3.1D/V5-His-TOPO Vektor

Nach der Isolation von peptidkodierenden Plasmiden in antigenpräsentierenden HLA-B27⁺-COS-7 (siehe Abschnitt 5.4.3.1) wurden die peptidkodierenden Bereiche der Einzelzellen amplifiziert (siehe Abschnitt 5.1.5.5) und die gereinigten PCR-Produkte in den pcDNA[™]3.1D/V5-His-TOPO Vektor gerichtet einkloniert. Durch die Verwendung eines Primers mit der 5'-Sequenz 5'-CACC wird dabei das PCR-Produkt an die komplementäre Sequenz im Topoisomerase-aktivierten Vektor ligiert.

Die Verwendung erfolgte genau nach Angaben des Herstellers, wobei die Hälfte der empfohlenen Vektormenge eingesetzt wurde und die Inkubationszeit bei 16°C über Nacht verlängert wurde, um eine vollständige Ligation sicherzustellen. Nach Präzipitation der ligierten Plasmide (siehe Abschnitt 5.1.3) wurden sie in hochkompetente ElectroMax DH10B mit höchstmöglicher Effizienz mit Elektroporation transformiert (siehe Abschnitt 5.2.2).

5.1.7 Restriktionsverdau und LigationSchneiden von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Bei einem analytischen Restriktionsverdau wurden 1 µg DNS in einem 30-µl-Ansatz eingesetzt. Bei einem präparativen Verdau betrug in einem Endvolumen von 100 - 200 µl die Menge der DNS 10 - 30 µg. Die zu verdauende DNS-Menge wurde mit 1/10 Volumen des Gesamtansatzes jeweils mit den vom Hersteller empfohlenen 10x Restriktionspuffer versetzt und mit Wasser auf das Endvolumen des Restriktionsansatzes gebracht. Pro µg zu verdauender DNS wurden 1 - 2 Einheiten Restriktionsenzym zugegeben. Der Ansatz wurde

gut gemischt und bei der für das jeweils verwendete Restriktionsenzym spezifischen Temperatur (in der Regel 37°C) mindestens 1 Stunde inkubiert.

Falls die DNS im Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig gespalten wurde, wurde ein Restriktionspuffer gewählt, in dem beide Enzyme optimale Aktivität besitzen. War dies nicht möglich, wurde die DNS zunächst mit dem Enzym verdaut, dessen Puffer die niedrigere Salzkonzentration aufweist. Anschließend wurde das erste Restriktionsenzym durch Hitze inaktiviert und durch „Aufsalzen“ die für das zweite Enzym optimale Salzkonzentration eingestellt. Schließlich wurde wiederum eine Stunde bei entsprechender Temperatur verdaut. Oder es wurde die DNS nach der ersten Spaltung durch eine Phenol-extraktion und eine Präzipitation gereinigt (siehe Abschnitt 5.1.3) und anschließend mit dem zweiten Restriktionsenzym verdaut.

Der Verdau wurde auf einem Agarosegel auf Vollständigkeit getestet.

Ligation von Restriktionsfragmenten und Vektoren

Vorwiegend wurde der linearisierte Vektor mit gereinigtem Restriktionsfragment mit Hilfe des Quick Ligation Kit nach Angaben des Herstellers ligiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Fragment betrug dabei mindestens 1:3, um den Erfolg der Ligation zu garantieren. Es wurde 50 ng linearisierter Vektor in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt.

Anschließend konnte der Ligationsansatz direkt in eine Transformation eingesetzt werden.

5.1.8 Polyacrylamidgelelektrophorese für die CDR3-Spektratypisierung

Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese mittels ALFexpress sequencer

Die vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde bei der CDR3-Spektratypisierung der VA-CA-Amplifikation der TZR α -Ketten verwendet.

Dafür wurde ein 4 %-iges Polyacrylamidgel mit 0,3 mm Dicke und 6 M Harnstoff in 1x TBE hergestellt. Vor dem Gießen des Gels und dem Zusammenbau der Apparatur wurden die Glasplatten sorgfältig gereinigt und mit 100 %-igem Ethanol nachgespült, da kleine Schmutzpartikel die Polymerisation und damit den Gellauf und die Laserdetektion beeinträchtigen können. Für ein 50 ml Gel wurden 18 g Harnstoff in 5 ml 10x TBE und 6,6 ml Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Durch kurzes Erhitzen löst sich der Harnstoff besser. Die Gellösung wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm) entgast. Unmittelbar vor Gießen des Gels wurden zügig 45 µl TEMED (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 175 µl 10 % APS dazugegeben, in eine 60-ml-Spritze aufgezogen und in die vorbereitete Gelkammer transferiert. Das Gel war in der Regel nach ca. 1 h vollständig auspolymerisiert und konnte nun mit den zu untersuchenden Proben beladen werden. Als Laufpuffer wurde 0,6x TBE verwendet.

Die Proben wurden jeweils mit einem internen Standard (ALFexpress™ Sizer™ 50-500 bp von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und dem gleichen Volumen an Auftragspuffer (5 mg/ml Dextran Blue 200 in deionisiertem Formamid, von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) versetzt, für 2 min bei 92°C denaturiert und dann bis zum Auftrag auf Eis aufbewahrt. Der Standard wurde als Vergleichsmöglichkeit auch noch einzeln in einer Spur aufgetragen (externer Standard). Vor dem Auftrag der Proben wurden die Taschen mit Hilfe

einer Spritze mit etwas Laufpuffer ausgespült, da sich in ihnen Harnstoff abgesetzt hatte, der den Einlauf der Proben in die Taschen verhindert hätte.

Der Lauf des Gels im ALFexpress sequencer erfolgte 400 min lang bei 1500 Volt, 38 mA und 34 Watt sowie einer Temperatur von 50°C. Zur Fragmentgrößenanalyse wurde die AlleleLocator Software (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet.

CDR3-Spektratypisierung mittels MegaBACE™ 1000

Die VA-JA-Amplifikate wurden am Kapillarsequenzierer MegaBACE™ 1000 (Amersham Bioscience) analysiert.

Zum Einsatz kamen jeweils 1,5 µl der PCR-Produkte, die mit 0,5 µl 3 M Ammoniumacetat und 10 µl 100 % Ethanol 60 Minuten bei -80°C präzipitiert wurden. Die gefällte DNS wurde mit einer Reihe verschiedener Ethanolkonzentrationen (100 %, 70 %) dehydriert und getrocknet und die gereinigte DNS in 5,75 µl Wasser und 0,25 µl MegaBACE™ ET400-R size standard (Amersham Bioscience) gelöst.

Der Auftrag der PCR-Produkte erfolgte in den Kapillarsequenzierers MegaBACE™ 1000 und die Auswertung der Daten und die Fragmentgrößenanalyse mit dem Software Programm MegaBACE™ Fragment Profiler 1.2 (Amersham Bioscience).

5.2 Arbeiten mit Bakterien

5.2.1 Anzucht und Konservierung von Bakterien

Anzucht auf Agarplatten:

Transformierte Bakterien wurden auf 1,5 %-igen Agar-LB-Platten ausplattiert, um sie über Nacht bei 37°C wachsen zu lassen. Für die Blau-Weiß-Selektion bei Verwendung von TOP10F'-Bakterien wurde auf vorgewärmte Platten 40 µl X-Gal (40 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 40 µl 100 mM IPTG ausplattiert.

Anzucht in Schüttelkulturen

Eine Schüttelkultur wurde angesetzt, wenn die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNS aus Bakterien benötigt wurde. Dafür wurde ein bestimmtes Volumen LB-Medium (5–500 ml, abhängig von der geplanten Plasmidisolierung) mit entsprechenden Selektionsantibiotika versetzt. Dazu wurden 50 - 100 µl Bakteriensuspension oder eine Bakterienkolonie zugegeben und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert.

Konservierung von Bakterien

Aliquots von Übernachtskulturen wurden auf Eis mit dem gleichen Volumen 2x Einfriermedium gemischt und bei -80°C eingefroren.

5.2.2 Transformation von Bakterien

Transformation durch Hitzeschock

Für eine Transformation durch Hitzeschock wurden chemisch kompetente Bakterien DH5 α oder TOP10F' oder XL10-Gold Ultracompetent Cells (siehe Abschnitt 4.2.1) auf Eis aufgetaut und mit 5 ng Plasmid oder 1 - 4 μ l Ligationsansatz vermischt. Die Transformation der verschiedenen Bakterien erfolgte nach der jeweiligen Anleitung der Hersteller. Es wurden 10 - 100 μ l der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation durch Elektroporation

Die Bakterien ElectroMAX™ DH10B™ (siehe Abschnitt 4.2.1) wurden nach der gerichteten TOPO Klonierung in den pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO Vektor (siehe Abschnitt 5.1.6) mit dem gereinigten und präzipitierten Ligationsprodukt (siehe Abschnitt 5.1.3) durch Elektroporation transformiert. 20 μ l der *E. coli* Bakterien wurden mit 2 μ l TOPO-Ligation in eine vorgekühlten Küvette mit 0,1 cm Elektrodenabstand pipettiert und bei 2 kV, 200 Ω und 25 mF im Gene Pulser™ (Bio Rad, Hercules, USA) elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten SOC-Medium wurden sie 1 Stunde bei 37°C angeschüttelt um dann in einem tausendfachen Volumen über Nacht in ampicillinhaltigen LB-Medium in einer Schüttelkultur heranzuwachsen. Zur Berechnung der Gesamtklonzahl spezifischer Klone, die die plasmidkodierte kombinatorische Peptidbibliotheken tragen, wurde zusätzlich eine 1/1000 Verdünnung auf Agarplatten ausplattiert, über Nacht inkubiert und Klone ausgezählt. Nach der Plasmid-isolation kann die Vektor-DNS direkt für die Reaktivierung in HLA-B27⁺-COS-7 transfiziert werden (siehe Abschnitt 5.4.3.2).

5.2.3 Analyse von transformierten Bakterienklonen

Transformierte Bakterien wurden mit Hilfe einer PCR auf das Vorhandensein eines Plasmids mit der gewünschten Insertion getestet. Dabei können die Bakterien direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Es muss lediglich die Anfangsdenaturierung auf 10 min verlängert werden, damit die Zellwand aufbricht und die Plasmid-DNS für die Taq-Polymerase zugänglich wird.

Für die PCR-Analyse wurden einzelne Bakterienkolonien von der Agarplatte in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension wurde 1 μ l in die Reaktion zusammen mit geeigneten Primern, die spezifisch für den einklonierten Bereich sind, eingesetzt. Die übrige Suspension wurde 1 h bei 37°C in 900 μ l LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum geschüttelt und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Nach Beendigung der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

5.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

5.3.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*/PBMC) wurde das EDTA-Blut über eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Dazu wurden je 4 ml Ficoll in einem 15-ml-Röhrchen vorsichtig mit 8 ml EDTA-Blut, das zuvor 1:2 mit Kulturmedium verdünnt worden war, vorsichtig überschichtet. Nach Zentrifugation für 20 min bei 2.600 rpm und ausgeschalteter Bremse, um eine Vermischung der Phasen zu vermeiden, wurden die Erythrozyten sedimentiert, das Plasma bildete den Überstand. Die gewünschten PBMC befanden sich in der Intermediärphase, welche vorsichtig abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 10 min, 1.300 rpm) und in Kulturmedium aufgenommen wurde.

Zur Stimulierung und Erhöhung der RNS-Expression der PBMC wurde das Lektin Phytohämagglutinin PHA verwendet. Zusätzlich wurde noch IL-2 zur Aktivierung der T-Lymphozyten angewendet. Dazu wurde zuerst die Konzentration der Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt und mit einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ PHA-M (Sigma, Taufkirchen) und 20 U/ml IL-2 (Biochrom KG, Berlin) versetzt. Danach wurde je 1 ml dieses Ansatzes pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde RNS aus den Zellen isoliert.

5.3.2 Kultur von Suspensionszellen und adhärent wachsenden Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Kulturmedien (siehe Abschnitt 4.3.2) in verschiedenen Gewebekulturflaschen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 % im Begasungsbrutschrank kultiviert. Alle Zentrifugationsschritte von Zellen wurden, falls nicht anders angegeben, bei 400 g für 10 min durchgeführt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer in einer Verdünnung von 1:2 mit Trypanblau (0,5 % Trypanblau in 1 x PBS) als Indikatorfarbstoff für tote Zellen.

Kryokonservierung von Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellsediment wurde in kaltem Einfriermedium aufgenommen, wobei die Konzentration auf $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt wurde. Davon wurden anschließend 1 ml Aliquots in sterile, gekühlte Kryoröhrchen überführt, bei -80 °C in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam eingefroren und später in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs (-196 °C) gelagert.

Auftauen von vitalen Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C kurz angetaut und sofort in Medium resuspendiert, um das toxische DMSO zu verdünnen. Suspensionszellen wurden anschließend sedimentiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen ausgesät, während adhärente Zellen direkt mit Mediumersatz nach 3 Stunden ausgesät wurden. Erforderliches Selektionsmedium für Transfektanten wurde zwei Tage nach Auftauen verwendet.

Suspensionszellen

Die Zellen des Maus-T-Zell-Hybridoms 58 α - β ⁻ und daraus hervorgegangener Transfektanten wurden in Suspensionskulturen in Gewebekulturflaschen in RPMI-Kulturmedium (siehe Abschnitt 4.3.2) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte, wenn ein Farbumschlag des Mediums auftrat. Dabei wurde ein Teil der Zellsuspension abgenommen, sedimentiert und in frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert.

Adhärenent wachsende Zellen

Die adhärenent wachsenden Maus-Fibroblasten-Zellen L929 (L-Zellen), sowie die Verpackungszelllinie GP+E wurden als Monolayer-Kulturen in Kulturflaschen in DMEM-Kulturmedium und die Affen-Nierenzelllinie COS-7 in RPMI-Kulturmedium (siehe Abschnitt 4.3.2) kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 90 % wurden diese zunächst mit PBS gewaschen um Serumproteine zu entfernen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin/1 mM EDTA in PBS) bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium inaktiviert.

5.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Elektroporation

Die Maus-Hybridomzelllinie 58 α - β ⁻, die keine TZR-Moleküle exprimiert, wurde mit den linearisierten Expressionsvektoren RSV5neo und RSV5hygro, in welche verschiedene cDNS von TZR β - bzw. TZR α -Ketten inkloniert worden waren, stabil kotransfiziert. Da diese Hybridomzellen untransfiziert über einen längeren Zeitraum in Kultur instabil sind, wurden sie nur solange propagiert bis sie eine für die Transfektion ausreichende Zellzahl erreicht hatten. Nach der Analyse der stabilen TZR α β -Transfektanten (58-TZR α β -Hybridom-CD8) wurden in einer gesonderten Elektroporation mit der gleichen Anleitung auch der Expressionsvektor pcDNA-NFAT-sGFP stabil transfiziert und mit Blasticidin (siehe Abschnitt 4.3.2) selektioniert. Für die Elektroporation wurde das von PD Dr. Klaus Dornmair (Martinsried) etablierte Verfahren modifiziert und optimiert (Wiendl et al., 2002).

Es wurden 8×10^6 Zellen pro Transfektion zweimal mit RPMI (ohne FCS bzw. Zusätze) gewaschen und anschließend in 800 μ l RPMI (ohne Zusätze) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette (Küvette 0,4 cm Elektrodenabstand, BioRad) transferiert und mit je 30 μ g Plasmid-DNS pro transfizierenden Expressionsvektor (linearisiert, präzipitiert und je in 50 μ l RPMI/ohne Zusätze steril gelöst) versetzt. Bei der Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand wurden die Zellen in 400 μ l RPMI aufgenommen. Das Gemisch wurde 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 960 μ F, 260 V und 0,26 kW in dem Gene Pulser[®] von Bio Rad (Hercules, USA) oder in dem

Electro Cell Manipulator 600 (BTX, San Diego, USA) mit den Bedingungen von 1300 μF , 129 Ω und 175 V. Nach der Pulsgabe wurde die Suspension in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml auf 37°C vorgewärmtem RPMI-Kulturmedium (mit Zusätzen) (siehe Abschnitt 4.3.2) überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz in eine TC75-Kulturflasche mit 20 ml ebenfalls angewärmtem RPMI-Kulturmedium überführt und 2 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Danach erfolgte die Selektion der Transfektanten zuerst auf den Vektor RSV5neo, der ein Neomycinresistenzgen enthält, mit Selektionsmedium mit je drei verschiedenen G418-Konzentrationen. Dazu wurden vom 30 ml Transfektionsansatz (Zellen in Kulturmedium) jeweils 10 ml mit einem doppelkonzentrierten G418-Selektionsmedium 1:1 verdünnt, so dass jeweils eine Antibiotika-Endkonzentration von 2,5 mg/ml, 2,25 mg/ml und 2,0 mg/ml entsteht. Dieser 3 x 20 ml pro Transfektionsansatz wurde in 1,25 ml Aliquots auf die Vertiefungen zweier 24-Loch-Flachbodenplatten gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden für mindestens 10 Tage bei 37°C ohne Erschütterung inkubiert, damit definierte Klone heranwachsen konnten. Diese Klone wurden dann einzeln mit einer gelben Pipettenspitze abgesaugt und in eine frische 24-Lochplatte mit Selektionsmedium überführt. Zur Aufrechterhaltung der Selektion wurde eine niedrigere Konzentration von 1,5 mg/ml G418 im Selektionsmedium verwendet. Zeigten die Klone ein schnelles Wachstum, wurden sie anschließend in einem Doppelselektionsmedium kultiviert, um auf den kotransfizierten Vektor RSV5hygro zu selektionieren. Wiederum wurden zuerst zwei verschiedene Hygromycin-Konzentrationen (0,4 mg/ml sowie 0,3 mg/ml) pro Klon eingesetzt, wobei die Aufrechterhaltung der Selektion mit der niedrigeren Konzentration stattfand. In diesem Doppelselektionsmedium wurden die Klone weitere 8 Tage bebrütet, bis doppelt positive Transfektanten stabil herangewachsen waren. Mit Hilfe von FACS-Analysen (siehe Abschnitt 5.4.1) und Interleukin-2-ELISAs (siehe Abschnitt 5.4.2.3) konnte getestet werden, welche der Klone einen funktionellen TZR an der Zelloberfläche exprimieren. Die Analyse der NFAT-induzierten sGFP-Expression erfolgte nach Stimulation mit anti-mCD3/hV β 1-Antikörpern mit Hilfe des Durchflusszytometers.

5.3.4 Transfektion von Zellen mit Lipofektion

Stabile Transfektion der COS-7 Zellen mit pTM-B27

Adhärente COS-7 Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 stabil transfiziert. In ein Loch einer 6-Loch-Platte wurden 8×10^5 COS-7-Zellen am Vortag ausgesät. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen, wobei 3 μg linearisierte, steril gelöste Plasmid-DNS und 3 μl Lipofectamine verwendet wurden.

Am nächsten Tag erfolgte die Selektion mit drei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (2,0/1,5/1,0 mg/ml G418). Dafür wurden die transfizierten COS-7 Zellen auf eine 6-Loch-Platte verteilt und 10 Tage im Brutschrank inkubiert, damit definierte Klone heranwachsen konnten. Anschließend wurden die G418-resistenten Klone isoliert und in einer 24-Loch-Platte in Selektionsmedium mit geringerer G418-Konzentration von 1 mg/ml angezüchtet und in der Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 5.4.1) auf die Expression von HLA-B27 getestet.

Transiente Transfektion der COS-B27-Zellen mit pcDNAlib bzw. pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]

Die Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken wurden mit FuGENE[®] HD in HLA-B27⁺COS-7-Zellen transient transfiziert, damit die translatierten Peptide auf HLA-B27 präsentiert werden und eine potentielle TZR-Aktivierung untersucht werden konnte. Es wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

Beim Ansatz zur Aufdeckung und Isolierung einer positiven Peptid tragenden COS-B27 nach Aktivierung von TZR-Transfektanten (siehe Abschnitt 5.4.3.1) wurden $1,5 \times 10^5$ COS-B27-Zellen in einem Zellkulturschälchen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 2 µg Plasmid-DNS (pcDNAlib) in 100 µl RPMI 1640/ohne Zusätze und 7 µl vorgewärmten, gut durchmischtem FuGENE[®] HD. 48 Stunden nach Transfektion wurden die 58-TZRαβ-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten zugegeben und weitere 16 Stunden kokultiviert bis sie am Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden (siehe Abschnitt 5.4.2.2).

Bei der Reaktivierung der TZR-Transfektanten mit der positiven Peptid-cDNS, deren PCR-Produkt in pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®] nach der Isolierung der einzelnen COS-7-Zelle subkloniert wurde (siehe Abschnitt 5.4.3.2), wurden jeweils Doppeltransfektionsansätze in einer 24-Loch-Platte für 48 Stunden und eine Platte für 72 Stunden bereit. Dafür wurden $2,5 \times 10^5$ COS-B27 Zellen pro Loch ausgesät und nach ihrer Adhärenz mit 25 µl Transfektionsreagenz (1 µg DNS in Gesamtvolumen von 50 µl RPMI 1640/ohne Zusätze mit 3,5 µl vorgewärmten FuGENE[®] HD gut vermischt pro Doppelansätze) versetzt und mit Peptid-cDNS in pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®] transient transfiziert.

5.3.5 Transduktion von Zellen mit Hilfe von Retroviren

Mit Hilfe von Retroviren wurden die Gene für den menschlichen CD8-Korezeptor in die TZRαβ-Transfektanten eingebracht, da bei der Erkennung von pMHC CD8 eine wichtige Rolle spielt. Bei der Transduktion wurde als Zelllinie für die Retrovirus-Produktion die Verpackungszelllinie GP+E verwendet, die den retroviralen Vektor pLPCX (Clontech, Mountain View, USA) mit humanen CD8 α- und β-cDNSs enthält und die von K. Dornmair zur Verfügung gestellt wurde. Die Verpackungszellen produzieren Virionen, die die Zielzellen infizieren. Am Vortag wurden die $1,5 \times 10^5$ GP+E & hCD8 in eine 6-Loch-Platte ausgebracht, und anschließend wurden 5×10^4 Zellen der zu transduzierenden Maus-Hybridomzellen pro ml Medium zugegeben und für 48 Stunden kokultiviert ohne Zugabe von Selektionsantibiotikum im Medium. Da das pLPCX-Plasmid ein Puromycin-Resistenzgen enthält, wurden die TZRαβ-CD8-Transfektanten nach zwei Tagen in RPMI-Dreifach-Selektionsmedium (siehe Abschnitt 4.3.2) weiterkultiviert. Der Erfolg der Transduktion konnte nach 4 - 5 Tagen mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 5.4.1) auf hCD8 Expression überprüft werden.

5.4 Funktionelle Analysen

5.4.1 Extrazelluläre Färbung und Durchflusszytometrie

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern getestet und mittels eines Durchflusszytometers (FACS *fluorescence activated cell sorting/scanning*) analysiert.

Für die Färbung von Zelloberflächenproteinen wurden 2×10^5 Zellen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Pro Zelllinie wurde zusätzlich eine Negativkontrolle erzeugt, die ohne Primärantikörper bzw. mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps (Isotypkontrolle) inkubiert wurde. Diese Zellen geben die Signalstärke an, die durch direkte Bindung des zweiten Antikörpers an die Zelloberfläche hervorgerufen wird. Die ausgesäten Zellen wurden einmal mit je 150 μ l Waschpuffer (5 % FCS in 1x PBS) gewaschen. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten 4 min bei 4°C und 800 g (Heraeus Megafuge 1.0R). Zur Markierung wurden je 40 μ l monoklonale Antikörperlösung (die Verdünnungen wurden vorher ausgetestet) zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 150 μ l Waschpuffer wurden die Zellen für 20 min mit 30 μ l Sekundärantikörper auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgten 3 weitere Waschschrte mit 150 μ l Waschpuffer, und nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 150 μ l Fixierlösung (1 % Paraformaldehyd in 1 x PBS) aufgenommen. Wenn die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden sollten, wurde unmittelbar vor der Messung Propidiumjodid (Endkonzentration von 100 ng/ml) zugegeben, dafür entfiel die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd. Die tote Zellpopulation wurde im Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal 3 detektiert und bei der Analyse der Zellen ausgeschlossen. Bei Detektion über einen direkt markierten ersten Antikörper wurden als Negativkontrolle ungefärbte Zellen eingesetzt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper sowie die folgenden Waschschrte entfielen. Mit Hilfe des FACS Calibur® Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) im Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried oder mit Hilfe des FACS Calibur® im Institut für Molekulare Immunologie im Helmholtz Zentrum München-Großhadern wurde die Färbung quantifiziert. Es wurden stets 10000 Zellen erfasst und mit Hilfe der Software CellQuest (Becton Dickinson) oder FlowJo 8.8.6 (Tree Star, Ashland, OR, USA) ausgewertet.

5.4.2 Nachweis der Funktionalität der T-Zell-Rezeptor-Transfektanten

5.4.2.1 Unphysiologische Aktivierung der TZR-Transfektanten mit Antikörpern

Die Kreuzvernetzung der TZR-Moleküle durch Bindung von spezifischen, monoklonalen Antikörpern führt zur unphysiologischen Aktivierung der T-Zellen. Die TZR-Aktivierung löst einen Signalübertragungsweg aus, der u.a. den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert, was

letztlich die Produktion und Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) steuert. Die NFAT-Aktivierung bzw. die IL-2-Produktion wurde herangezogen, um die Funktionalität des TZR der transfizierten TZR-Mauszellhybridome zu untersuchen.

Zur Stimulierung wurden zum einen ein monoklonaler Antikörper gegen Maus-CD3 ϵ (Stammlösung 0,5 mg/ml) und zum anderen Antikörper gegen humanes V β 1 (Stammlösung 0,1 mg/ml) des transfizierten TZR verwendet. In die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenplatte wurden 50 μ l des jeweiligen Antikörpers in einer PBS-Verdünnung von 1:500 pipettiert und mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert, damit sich der Antikörper an den Boden der Platte anlagern kann. Anschließend wurde die Lösung sorgfältig abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen, ohne den Antikörper austrocknen zu lassen. Danach wurden 5×10^4 Zellen des entsprechenden Klons in Kulturmedium pro Vertiefung dazugegeben und für 16 - 18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand der einzelnen Vertiefungen wurde abgenommen und in einem ELISA (siehe Abschnitt 5.4.2.3) der IL-2 Gehalt bestimmt.

Nach der Transfektion der 58-TZR $\alpha\beta$ -CD8-Transfektanten mit dem Vektor pcDNA-NFAT-sGFP konnte die Aktivierung des TZRs über die durch NFAT induzierte sGFP-Expression analysiert werden. Die mCD3/hV β 1-Stimulierung erfolgte dabei wie oben beschrieben, wobei auch je nach Bedarf eine größere Zellzahl (in 24-Loch-Platten je Vertiefung $1,5 \times 10^5$ Zellen) aktiviert wurde. Die Antikörper-Stimulierung diente stets als Positivkontrolle in TZR-Aktivierungsexperimenten und die mögliche Fluoreszenz wurde anhand des FACS-Gerätes oder im Fluoreszenzmikroskop analysiert (siehe Abschnitt 5.4.2.4).

5.4.2.2 Spezifische Aktivierung der TZR-Transfektanten über pHLA-B27

TZR-Aktivierung nach Peptidbeladung:

Um eine mögliche Reaktivität der spezifischen TZR β^{ReA} -Kette gegen potentielle arthritogene Peptide zu untersuchen, wurden die HLA-B27 transfizierten L929-Zellen mit dem HLA-B27-restringierten Aggrecanpeptid der Aminosäure 667 bis 675 beladen und mit den TZR-Transfektanten (58-TZR $\alpha\beta$) kokultiviert. Die IL-2-Sekretion diente auch hier als Maß der T-Zell-Aktivierung bei Bindung des TZR an das spezifische pB27-Molekül.

Als Positivkontrolle gilt hier die Maus-TZR-Hybridomzellen JM22, deren IL-2 Sekretion durch die Aktivierung mit HLA-A*02 präsentierten flu-(58 - 66) Peptid induziert wird.

Dafür wurden zwei Tage vor dem Stimulationsexperiment die adhärennten L929-Zellen (je 3×10^4 Zellen in 200 μ l Kulturmedium), die mit dem entsprechenden humanen HLA-Molekül HLA-A*02 oder HLA-B27 transfiziert waren, in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wurden am folgenden Tag für 4 - 6 Stunden mit dem flu-Peptid (5 μ M) oder dem Aggrecan-Peptid in einer Konzentration von 100 μ M in 100 μ l Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden 4×10^5 TZR-Transfektanten zugegeben und für 13 - 16 Stunden bei 37°C stiumliert. Die IL-2-Konzentration der Überstände wurde mit Hilfe des IL-2-ELISA gemessen.

Aktivierung nach transienter Transfektion mit Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptid-Bibliotheken

Waren die COS-B27-Zellen 48 oder 72 Stunden nach transienter Transfektion mit unterschiedlichen Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptid-Bibliotheken (pcDNA lib) (siehe Abschnitt 5.3.4) 80 - 100 % konfluent, wurden die 58-TZR-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten zugegeben, da nach dieser Zeit die höchste Peptid-Präsentation stattfand (Siewert et al., 2012). Dabei wurden nach zwei Waschschritten mit PBS für die 3,5 cm Schälchen 4×10^5 Zellen und für die 24-Loch-Platten bei den Reaktivierungsversuchen $1,5 \times 10^5$ TZR-Transfektanten in RPMI-Kulturmedium zugegeben. Nach 16 Stunden Kokultivierung konnte eine mögliche TZR-Aktivierung anhand der sGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (siehe Abschnitt 5.4.2.4).

5.4.2.3 Nachweis der TZR-Aktivierung mit Interleukin-2 ELISA

Zum Nachweis der Aktivierung der TZR-Transfektanten (58-TZR $\alpha\beta$ -CD8) nach Stimulierung wurde ein ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) für IL-2 der Maus eingesetzt. Dafür wurde der Kit Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go von der Firma eBioscience (San Diego, USA) verwendet. Das Beladen der Maxisorb-96-well-Flachbodenplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit dem anti-Maus-IL-2-Antikörper erfolgte am Tag vor der Durchführung des ELISAs. Als Waschpuffer diente 1x PBS/0,05 % Tween-20. Es wurde genau nach Angaben des Herstellers verfahren.

In einem ELISA-Reader (E^{\max} von MWG-Biotech, Ebersberg) wurde gemessen, wie viel Licht der Wellenlänge 450 nm die einzelnen Proben absorbierten. Die Absorption ist proportional zur Menge des umgesetzten Substrates und damit zur ursprünglich in der Probe enthaltenen IL-2-Menge. Mit Hilfe der Standardkurve konnten quantitative Aussagen zur IL-2-Produktion der einzelnen Klone im Bereich von 5 - 1000 pg/ml gemacht werden.

5.4.2.4 Nachweis der TZR-Aktivierung anhand der sGFP-Expression

Die Aktivierung der 58-TZR $\alpha\beta$ -CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten nach Antikörperstimulierung oder nach HLA-Peptid-Stimulierung durch Kokultivierung mit COS-B27-pcDNA lib resultiert in eine NFAT-induzierte sGFP-Expression. Die intrazelluläre grüne Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzmikroskop und in der Durchflusszytometrie untersucht.

Bei der Analyse im Durchflusszytometer wurden die TZR-Transfektanten nach 16 - 18 Stunden Antikörperstimulierung dreimal mit je 150 μ l Waschpuffer (5 % FCS in 1x PBS) gewaschen und in 150 μ l Fixierlösung (1 % Paraformaldehyd in 1 x PBS) aufgenommen. Anschließend konnten die Fluoreszenz der sGFP-Expression im FACS-Gerät quantifiziert werden (siehe Abschnitt 5.4.1)

Das grün fluoreszierende Protein wurde durch Anregung mit blauem Licht (Emission von 498/515 nm) im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Verwendet wurde hierfür das Fluoreszenzmikroskop am Institut für Klinische Neuroimmunologie der LMU bei PD Dr. K. Dornmair [AxioVert 200M (Zeiss) mit CCD-Kamera (CoolSNAP-HQ, Roper Scientific), Fluoreszenzlampe (HXP120, Visitron) und Zeiss Objektiven (5x, NA 0.15; $\infty/0$, Epiplan-

NEOFLUAR; 10x, NA 0,45 Plan Achromat; 20x, NA 0,4; $\infty/0-1,5$ Achroplan, Korr Ph2)]. Verwendet wurde ein GFP-Filter (Anregung/Emission: 472(30)/520(35) nm; Semrock, BrightLine) und zum Ausschluss von Autofluoreszenz ein Cy3-Filter (Anregung/Emission: 545(25)/605(70) nm; Zeiss). Die Mikroskopieaufnahmen wurden mit dem Programm MetaMorph (Molekular Devices, Sunnyvale USA) aufgenommen und die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ 1.46r (NIH, Bethesda, USA).

5.4.3 Analyse der Plasmid-kodierten Antigene nach T-Zell-Aktivierung

Der Ablauf einzelner aufeinander folgender Arbeitsschritte zur Analyse der verschiedenen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken nach T-Zell-Aktivierung wird hier zur Veranschaulichung mit jeweiligem Verweis auf die entsprechenden Methodenabschnitte aufgezählt. Der Aufbau der Versuchsreihe entspricht dem in der Veröffentlichung von Siewert et al., 2012.

- Präsentation des exprimierten Peptids auf HLA-B27 durch transiente Transfektion der COS-B27-Zellen mit Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken (pcDNAlib) (siehe Abschnitt 5.3.4)
- TZR-Aktivierung durch Zugabe von 58-TZR $\alpha\beta$ -CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten nach 48 oder 72 Stunden und weitere 16 Stunden Kokultur (siehe Abschnitt 5.4.2.2)
- Aufdeckung potentieller TZR-Aktivierung durch sGFP-Expression mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 5.4.2.4)
- Isolierung der positiven Antigen-präsentierenden COS-B27-Zelle durch Mikromanipulation (siehe Abschnitt 5.4.3.1)
- Untersuchung des isolierten Plasmid-kodierten Antigens
 - Amplifikation der Peptidbibliotheken-Insertionen mit Einzelzell-PCR (siehe Abschnitt 5.1.5.5)
 - Gerichtete TOPO Klonierung in den pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO Vektor (siehe Abschnitt 5.1.6)
 - Transformation mit Elektroporation in Bakterien ElectroMAXTM DH10BTM (siehe Abschnitt 5.2.2) sowie Isolierung der Plasmid-DNS (siehe Abschnitt 5.1.1)
- Reaktivierung durch erneute transiente Transfektion der COS-B27-Zellen (siehe Abschnitt 5.3.4) mit kodierten Peptiden (in pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO) und Inkubation mit 58-TZR $\alpha\beta$ -CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten (siehe Abschnitt 5.4.2.2) um das positive Plasmid-kodierte Antigen zu verifizieren
- ↻ Anreicherung des potentiell positiven cDNS-Plasmids in Bakterien-Subpools (siehe Abschnitt 5.4.3.2) sowie wiederholte Reaktivierungsschritte bis zum Erhalt eines positiven homogenen Plasmid-Antigens eines Bakterienklons
- Sequenzierung des positiven Plasmid-kodierten Antigens und Untersuchung der gefundenen Mimitope

5.4.3.1 Isolierung der positiven Antigen-tragenden Zelle durch Mikromanipulation

Wird bei der Analyse der TZR-Aktivierung nach 16 Stunden Stimulation mit antigen-präsentierenden Zellen, die Peptidbibliotheken auf HLA-B27 exprimieren (siehe Abschnitt 5.4.2.2), im Fluoreszenzmikroskop eine Anhäufung, ein so genanntes Cluster von grün fluoreszierende TZR-Transfektanten aufgedeckt, wurde die darunter liegende adhärenente COS-B27-Zelle mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert (LN25 Mini). Dieser Mikromanipulator erlaubt eine Feinjustierung und Bewegung von wenigen μm . Eine Glaskapillare (15 μm Durchmesser mit schräger Spitze, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde in einen Mikroinjektor (CellTram[®] vario, Eppendorf) eingespannt und ermöglichte eine Isolierung einer einzelnen COS-B27-Zelle mit nur geringem Volumen an Medium (etwa 1 - 3 μl). Die Einzelzelle wurde in ein PCR-Gefäß mit 7 μl Wasser transferiert, auf Eis gelagert und sofort mit einer Einzelzell-PCR das antigenkodierende Plasmid amplifiziert (siehe Abschnitt 5.1.5.5).

5.4.3.2 Analyse des isolierten Plasmids durch Reaktivierung von Plasmid-Subpools

Nach der Isolierung der einzelnen COS-B27-Zelle durch Mikromanipulation (siehe Abschnitt 5.4.3.1) und der darauf folgenden Amplifikation und Subklonierung in pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO enthält die Plasmid-DNS eine heterogene Population an kodierten Peptiden. Um davon das positive Peptid, das zur TZR-Aktivierung geführt hat, herauszufiltern, wurden nach einer erfolgreichen ersten Reaktivierung Bakterien-Subpools (jeweils mit einer Menge von 30) gebildet, davon jeweils Plasmid-DNS isoliert und erneut in unabhängigen Ansätzen in COS-B27 Zellen transfiziert zur Bestimmung der TZR-Reaktivierung. Durch fortwährende Reaktivierungsschritte und Weiterführung der jeweils positiven Plasmide wurde in weiteren Bakterien-Subpools die Plasmidanzahl verringert und das positive kodierte Peptid immer weiter angereichert bis eine homogene Plasmidpopulation in einem Bakterienklon vorlag. Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurden zusätzlich zur Messung des OD-Wertes im Spektrofotometer jeweils Bakterien in definierten Verdünnungen ausplattiert. Nach einer finalen Anreicherung der heterogenen peptidkodierenden Plasmide bei einer Anzahl von weniger als 300 Bakterien, wurden die Bakterienkulturen auf Agarplatten ausplattiert. Von den Einzelkolonien, die nun eine homogene Plasmid-Population ohne unterschiedliche cDNS-Insertionen enthalten, konnten direkt Plasmid-DNS isoliert werden und diejenigen, die zu einer positiven TZR-Reaktivierung führten, wurden sequenziert (siehe Abschnitt 5.1.4).

6 Ergebnisse

6.1 Identifizierung der TZR β^{ReA} -assoziierten α -Kette

T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von ReA-Patienten zeigten in einer früheren Studie eine monoklonale Expansion einer TZR β^{ReA} -Kette mit der so genannten kanonischen CDR3- β -Konsensussequenz (May et al., 2002). Das endgültige Ziel wäre die Aufdeckung des potentiellen Antigens, welches die Proliferation der klonalen T-Zellen induziert hat. Jedoch kann nur durch die Kenntnis der Paarung einer α - mit einer β -Kette zum funktionellen Rezeptor eine Antigenstruktur abgeleitet werden. Bisher wurde allerdings noch nicht die dazugehörige α -Kette, die mit dieser expandierten β^{ReA} -Kette den potentiell pathogenen ReA-klontypischen TZR ausbildet, identifiziert. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Synovialzellen, die eine klonale Expansion der TZR β^{ReA} -Kette aufwiesen, auf das Vorhandensein einer klonalen Expansion von α -Ketten mit Hilfe der CDR3-Spektratypisierung untersucht. Monoklonal vorliegende α -Ketten könnten Aufschluss geben über die TZR β^{ReA} -assoziierte α -Kette zur Ausbildung eines potentiell pathogenen TZR. Im weiteren Verlauf können diese rekonstruierten TZR zu einer Antigen suche herangezogen werden.

In einer davon unabhängigen Versuchsreihe wurden des Weiteren die TZR α -Ketten von Einzelzellen aus der Synovialflüssigkeit von ReA-Patienten, die auf die TZR β^{ReA} -Kette vorsortiert wurden, analysiert.

6.1.1 Expandierte TZR α -Ketten von ReA-Patienten

Für die spezifische Antigenerkennung ist die CDR3-Region, der Bereich der V-(D)-J-Verknüpfungsstelle in der α - oder β -Kette des TZR entscheidend. Die Längenvariation dieser Region kann durch das Verfahren der CDR3-Spektratypisierung sichtbar gemacht werden. So zeigt sich eine heterogene T-Zell-Population mit unterschiedlichen CDR3-Längen als Gauß-Normalverteilung. Gleiche CDR3-Sequenzen mit definierter Länge erscheinen als definiertes Maximum und offenbaren monoklonal expandierte T-Zellen mit identischen TZR. Die anschließende Sequenzierung der in der Spektratypisierung aufgezeigten monoklonal expandierten CDR3-Sequenzen dient dazu sicher zu stellen, dass es sich wirklich um eine monoklonal identische TZR-Kette handelt. Ein sichtbares Maximum kann auch durch eine zufällig gleich lange CDR3-Sequenz auftreten, obwohl es sich um eine polyklonale Sequenz handelt.

Zur Identifizierung der assoziierten α^{ReA} -Kette wurden verschiedene CDR3-Spektratypisierungen von TZR α -Ketten in cDNS von Synovialzellen von Patienten mit ReA durchgeführt. Die Basis bildete Ergebnisse der vorhergehenden Diplomarbeit (Schönwetter-Steer, 2005). Anhand von RNS aus $\text{V}\beta 1$ -vorsortierten Synovialzellen mit expandierter klonotypischer TZR β^{ReA} -Kette einer HLA-B27⁺-ReA-Patientin erfolgte eine Definition von sechs TZR β^{ReA} - α -Kandidaten-Ketten. Diese Vorarbeiten für das hier verwendete Material sind im Abschnitt 4.1.6 (S. 28ff) dargestellt. In der vorliegenden Arbeit war es von besonderem

Interesse die monoklonal expandierten TZR α -Ketten näher zu charakterisieren und ihr Vorkommen in anderen ReA-Patienten zu identifizieren. Die genaue Durchführung der verschiedenen α -Ketten-Spektratypisierungen wird im Methodenteil in Abschnitt 5.1.5.3 (S. 42) beschrieben, wobei die dort befindlichen Abbildung 4 und Abbildung 5 die unterschiedlichen Amplifikationen mit Primerbindestellen veranschaulichen.

6.1.1.1 Identifizierung von CDR3-Regionen der TZR α -Kandidaten-Ketten bei ReA-Patienten

Die CDR3-Regionen der sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten in verschiedenen ReA-Patienten wurden mit der VA-JA-Spektratypisierung näher charakterisiert. Eine gezielte Eingrenzung erfolgte durch die Verwendung der Primerpaare von VA-JA. Dabei wurden dieselben ursprünglichen Amplifikate (VA-CA) der Synovialzellen von fünf ReA-Patienten und als Kontrollen zweier gesunder Spender wie bei der vorhergehenden VA-CA-Spektratypisierung in eine semi-nested-PCR eingesetzt, wobei die 5'-Primern mit Bindung in den VA-Elementen gleich blieben. Dagegen dienten jeweils als 3'-Primer fluoreszenzmarkierte JA-Oligonukleotide, die spezifisch in den gesuchten JA-Elementen binden (JArev-FAM bzw. JArev-TET, siehe Abbildung 4, S. 43ff). Zum Vergleich der unterschiedlichen Fragmentgrößen wurden die VA-JA-Fragmente der cDNS 2.5.2.1 als Referenz mitgeführt. Detektiert wurden die VA-JA-Amplifikate am Sequenzierer MegaBACE™ 1000. Das Ergebnis der Spektratypisierung ist in der Abbildung 7 auf folgender Seite gezeigt.

Auffällig an der Fragment-Analyse war, dass diese enger eingegrenzte VA-JA-Spektratypisierung bei keiner untersuchten TZR α -Kette eine Normalverteilung zeigte, was durch die Einschränkung mittels spezifischer JA-Elemente bedingt und zu erwarten war. Von den verschiedenen Amplifikationen scheinen einige α -Ketten die gleiche Länge wie die Vergleichsamplifikate der monoklonalen Kandidaten- α -Kette aufzuweisen. Sie liegen jedoch trotz näherer Eingrenzung durch die VA-JA-Amplifikation nicht ausnahmslos monoklonal vor und weisen ersichtlich durch mehrere Spitzen auf das Vorhandensein verschiedener TZR-Umlagerungen innerhalb einer VA-JA-Kombination hin. Das CDR3-Repertoire der α -Ketten liegt größtenteils oligoklonal vor. Bei einzelnen CDR3-Umlagerungen kann aber eine Verschiebung zu einer dominanten Spitze festgestellt werden.

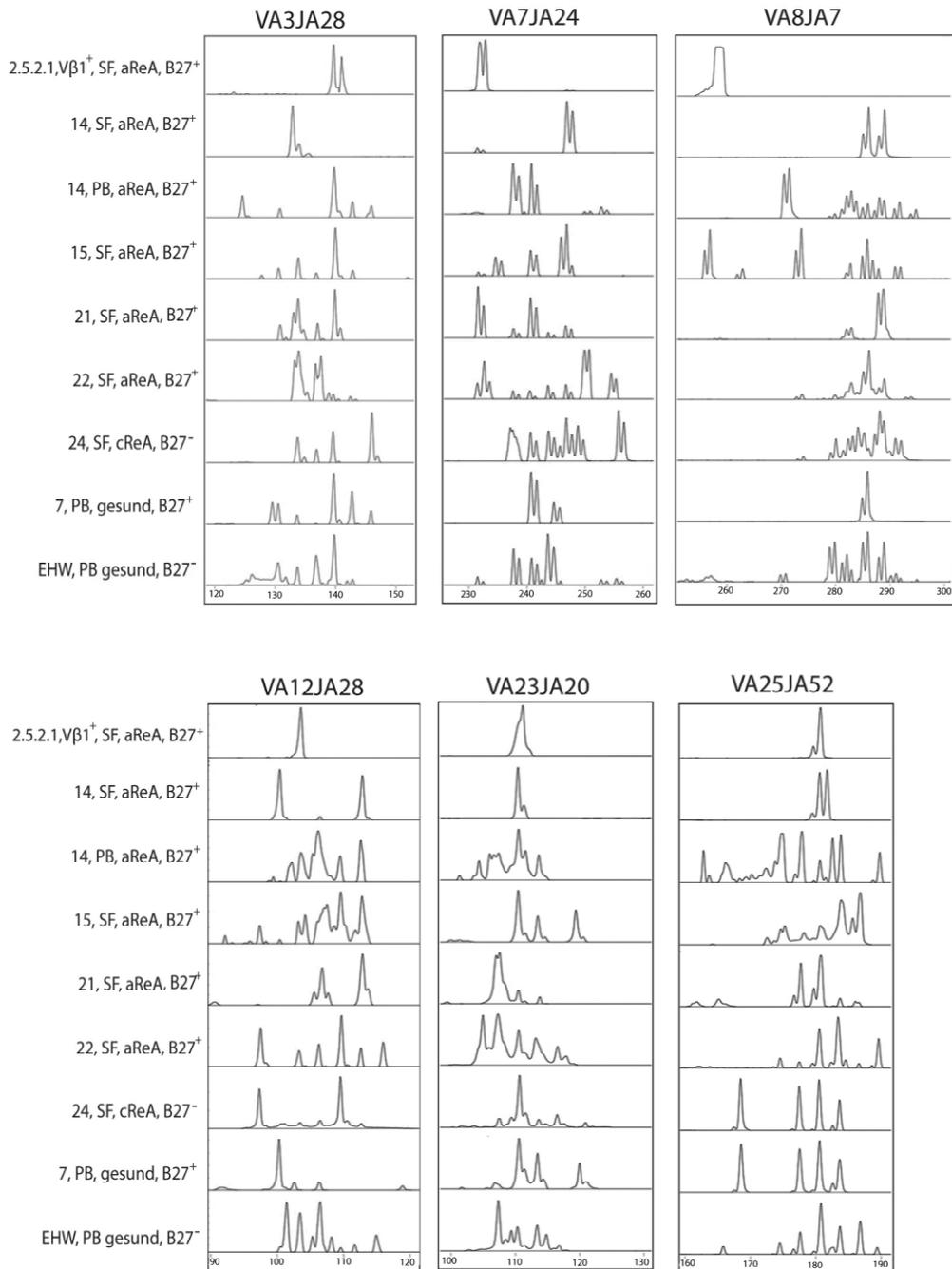


Abbildung 7: VA-JA-CDR3-Spektratypisierung der TZR α -Kandidaten-Ketten

Die CDR3-Spektratypisierung wurde mit den Primerpaaren VA-JA auf die sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten hin untersucht. Als Matrize dienten die Amplifikate (VA-CA) der Synovialzellen von fünf ReA-Patienten und als Kontrolle zweier gesunder Spender, die in einer semi-nested-PCR mit Fluoreszenzmarkierten JA-Primer eingesetzt und im Sequenzierer detektiert wurden. Zum besseren Vergleich der Längen der Kandidaten-Ketten-Amplifikate mit der Referenz von V β 1⁺-RNS der Synovialzellen 2.5.2.1, wurden sie nach VA-Segmenten geordnet auf dem Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetrennt und sind im Bild untereinander aufgereiht.

Die Beschreibung der Patienten mit Nummer, Zelltyp (SF: Synovialzellen, PB: Peripheren Blutlymphozyten), Erkrankung (aReA/cReA: akute/chronische Reaktive Arthritis) und HLA-B27 Typisierung (B27⁻/B27⁺) ist jeweils links pro Spur angegeben. Die VA-Genfamilie ist darüber angegeben und gilt jeweils für alle 9 Proben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind Teile der Gele entfernt und nur die entsprechenden Basenpaare gezeigt. Die entsprechende Basenpaarlänge pro VA-Gruppe ist darunter angegeben. Die x-Achse stellt also die Basenpaarlänge dar und die y-Achse die Häufigkeit einer bestimmten CDR3-Länge (relative Leuchtintensität fluoreszierender Fragmente).

Die verkürzte Kandidaten-Kette VA8JA7 kommt singularär bei den V β 1⁺-sortierten Synovialzellen der Patientin 2.5.2.1 vor, da die anderen Untersuchten fast ausschließlich eine deutlich um bis zu 30 bp längere CDR3-Umlagerung anzeigen. Deshalb wurden diese VA8-Ketten verschiedener Patienten nicht näher charakterisiert.

Auch die VA7JA24-Ketten wurden nicht weiter verfolgt und deren Sequenzen analysiert. Zum Einem wurden schon im Hinblick auf die vorangegangene VA-CA-Spektratypisierung von der Referenzlänge abweichende CDR3-Längen der Untersuchten offenbart (siehe Abschnitt 4.1.6). Zum anderen deuten ausschließlich zwei Spitzen (bei 21SF und 22SF) auf eine etwa gleich lange Umlagerung hin. Diese sind jedoch sehr geringfügig vertreten, ersichtlich an der niedrigen Maximumhöhe (bei 22SF) und die Spitze bei Patient 21SF ist um ein bis zwei Nukleotide kürzer als die von 2.5.2.1.

Bei den anderen vier α -Kandidaten-Ketten zeigen sich jedoch innerhalb der oligoklonalen VAJA-Umlagerungen dominante Spitzen, die exakt gleiche Längen wie die Referenz aufweisen. Alle 26 Amplifikate mit besonderem Interesse wurden analysiert.

Von den VA3JA28-PCR-Produkten sind die fünf dominanten Verschiebungen bei den Patienten 14PB, 15SF, 21SF, 7PB und EW PB näher zu charakterisieren. Die gleich lange niedrige Spitze bei Patient 24SF wurde aufgrund der geringen Häufigkeit ausgeschlossen.

Bei der Amplifikation von VA23JA20 sind einige Umlagerungen der sieben dominanten weiter charakterisierten Umlagerungen der gleich langen Spitzen bei 14SF, 14PB, 15SF, 21SF, 22SF, 24SF und 7PB sogar als singularäre Maxima sichtbar (14SF, 15SF, 21SF und 24SF), was eine mögliche monoklonale CDR3-Region beinhalten könnte. Obwohl die Fragmentlänge von 21SF zwar um drei Nukleotide kürzer als die VA23JA20-Kandidaten-Kette ist, wurde sie weiter analysiert zum Vergleich mit der gleich langen Spitze in der oligoklonalen Verteilung bei Patient 22SF und zur Erkenntnis ihrer monoklonalen Sequenz.

Nur das CDR3-Repertoire der peripheren Blutzellen bei Patient 14PB zeigt bei VA25JA52 keine dominante Expansion und eine sehr niedrige gleich lange Verschiebung wie die Referenzlänge. Alle anderen Patienten / gesunde Spender von sieben Amplifikaten bei VA25JA52 (14SF, 15SF, 21SF, 22SF, 24SF, 7PB und EW PB) wurden untersucht.

Wenngleich die Längen der VA12JA28-Amplifikate von der monoklonalen Vergleichs-amplifikation der V β 1-sortierten 2.5.2.1 abweichen, wurden die sieben PCR-Produkte von 14SF, 14PB; 15SF, 21SF, 22SF, 24SF und 7PB genauer untersucht. Die dominanten gleich langen Spitzen zwischen zwei (gleich lange Spitze von 22SF und 24 SF bzw. von 14SF und 7PB) oder vier untersuchten Proben (gleich lange Spitze bei 14SF, 14PB, 15SF und 21SF) könnten auf eine identische α -Ketten-Sequenz zwischen anderen Patienten hinweisen. Die nähere Charakterisierung der 26 Amplifikate mittels Subklonierungen und Sequenzierungen werden im nächsten Abschnitt 6.1.1.2 beschrieben.

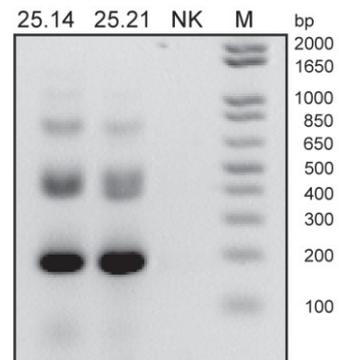
6.1.1.2 Sequenzanalyse der TZR α -CDR3-Regionen verschiedener ReA-Patienten

Um die Sequenzen der gleich langen dominanten Spitzen verschiedener α -Ketten von besonderem Interesse bestimmen zu können, wurden die betreffenden 26 Amplifikate jeweils subkloniert.

Die für die Detektion im Sequenzierer fluoreszenzmarkierten Amplifikate können nicht direkt in einen Vektor subkloniert werden. Deshalb wurden erneut semi-nested PCR (VA-JA) mit den ursprünglichen VA-CA-Amplifikaten verschiedener Patientenzellen als Matrize durchgeführt. Die Gegenprimer waren hier dementsprechend die unmarkierter 3'-Primer JArev, (siehe für Primerbindestellen Abbildung 5, S. 43 im Methodenteil). Durch die Verwendung einer Taq-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) wurde sichergestellt, dass keine Mutationen durch fehlerhaften Nukleotideinbau auftraten. Die erhaltenen 26 Amplifikate mit einer erwarteten Länge zwischen 100 und 200 Basenpaaren wurden durch die Auftrennung auf einem Agarosegel überprüft. Als Beispiel der Subklonierungen wird in Abbildung 8 das Ergebnis der Amplifikation der α -Kette VA25JA52 der Patienten 14SF und 21SF (Nummerierung 25.14 und 25.21) gezeigt.

Abbildung 8: Beispiel der VA-JA-Amplifikation der cDNS von Synovialzellen zweier Patienten zur CDR3-Sequenzanalyse

1/25 der VA25-TCA4-Amplifikate der VA25-Kette (398 bp) zweier Patienten (25.14, 25.21) wurden in eine semi-nested PCR mit dem Primerpaar VA25-JA52rev eingesetzt und $\frac{1}{4}$ des Amplifikats auf einem 1,5 %-igen Agarosegel aufgetragen. Bei der Negativkontrolle (NK) wurde keine Matrize in die PCR eingesetzt. Die starke Bande bei 179 bp zeigt das zu erwartende Fragment. Die Fragmentlängen des Markers (M) sind rechts in Basenpaaren (bp) angegeben.



Insgesamt konnten 25 der 26 VA-JA-Amplifikate, wie exemplarisch gezeigt, nachgewiesen werden. Nur bei der semi-nested PCR des Fragments VA23JA20 bei Patient 14SF konnte trotz vierfacher Wiederholung kein Fragment der erwarteten Größe von 111 bp amplifiziert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die VA23JA20-Amplifikationen der anderen Patienten brachten jedoch mit dem unmarkierten 3'-Primer JA20rev die gewünschten Fragmenten hervor.

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits wurden die 25 Amplifikate jeweils in den pCR II-Vektor ligiert, in TOP10F'-Bakterien transformiert und nach Kultivierung auf ampicillinhaltigen Agarplatten über Nacht selektioniert. Die erhaltenen Transformandenkolonien konnten durch PCR-Analysen mit den M13-Primern, die vor und nach einer Insertion im pCR II-Vektor binden, auf vorhandene Insertionen überprüft werden. Nach Auftrennung im Agarosegel konnten die Transformanden grob der gesuchten VA-JA-Größe zugeordnet werden, was exemplarisch für die Insertion von VA25JA52 in pCR II (bei Patient 14SF und 21SF) in Abbildung 9 demonstriert ist.

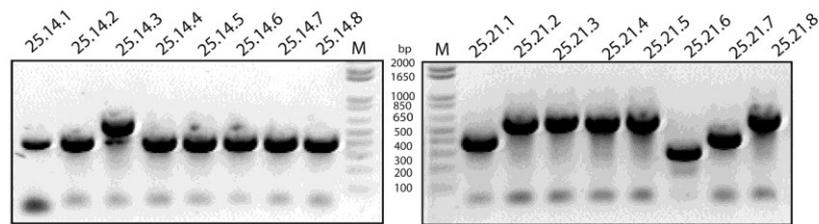


Abbildung 9: PCR-Analyse von pCR II-Transformandenklonen mit dem M13-Primerpaar

Das Vorhandensein einer Insertion im pCR II-Vektor nach der Subklonierung der VA25JA52-Amplifikationen von cDNS aus Synovialzellen zweier Patienten (25.14 und 25.21) wurde mit einer PCR-Analyse mit dem M13-Primerpaar bei Bakterienklonen getestet. Die Hälfte der Amplifikation wurde auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Das gesuchte VA25JA52-Fragment (179 bp) hat zusammen mit dem M13-Primer-Fragment (252 bp) eine Gesamtgröße von 431 bp (links: alle Banden außer 25.14.3; rechts: 25.21.1, 25.21.7). Die größeren sechs Banden von 25.14.3 (links) und im rechten Bild 25.21.2 bis 25.21.5 und 25.21.8 entsprechen jeweils der Insertion VA25-TCA4-M13 mit 650 bp. Die kleinere Bande von 25.21.6 (rechts) entspricht dem M13-Fragment ohne Insertion von 252 bp. In der Mitte sind zur Orientierung die Fragmentlängen des Größenstandards 1kb+ (M) in Basenpaaren angegeben.

Die gesuchten Längen umfassen das Fragment der M13-Primer im pCR II-Vektor von 252 bp mit der Insertion der entsprechenden VA-JA-Fragmente von 100 bis 200 bp (im gezeigten Beispiel von VA25JA52-M13 sind es 431 bp). Bei den Transformanden mit einer längeren Insertion handelt es sich um noch im subklonierten PCR-Produkt vorhandene VA-CA-Fragmente der ursprünglichen Amplifikation, die entsprechend um jeweils etwa 200 bp größer sind (550 bp bis 650 bp; das VA25-TCA4-M13-Fragment hier ist 650 bp lang).

Um die geringen Größenunterschiede genauer sichtbar zu machen, wurden von den Bakterienklonen mit der richtigen Länge der Insertion Plasmid-DNS isoliert. Anhand der Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym *EcoR* I, das im Vektor pCR II unmittelbar stromauf- und -abwärts der Insertion schneidet, konnten die VA-JA-Fragmentlängen bestimmt werden (nicht gezeigt).

Anschließend wurden mindestens drei Klone mit der richtigen VA-JA-Länge sequenziert. Die CDR3-Region konnten dann mit der Referenzsequenz des monoklonalen α -Ketten-Kandidaten verglichen werden. Die Anzahl der Transformandenklone der 25 unterschiedlichen Subklonierungen, die mittels PCR und Restriktionen analysiert und schließlich sequenziert wurden, sind in Tabelle 1 der folgenden Seite als Übersicht aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der durchgeführten Analysen bei der Subklonierung von 25 VA-JA-Amplifikaten verschiedener ReA-Patienten

Die Anzahl der Analysen der Subklonierungen von VA-JA-Amplifikaten in den pCR II-Vektor zum Erhalt der Sequenzen der CDR3-Regionen verschiedener ReA-Patienten sind jeweils angegeben. Dabei wurde die richtige Insertionslänge der Plasmide der Transformandenklone mittels PCR-Analysen und mit Restriktionsverdauung bestimmt und die positiven Klone sequenziert.

TZR α -Kette	Patientennummer	Anzahl in der PCR-Analyse	Restriktionsverdau <i>EcoR</i> I	Positive Klone	Anzahl der Sequenzen
VA3JA28	14PB	16	6	2	2
	15SF	16	5	4	4
	21SF	8	2	2	2
	7PB	8	3	3	3
	EW PB	8	5	3	3
VA12JA28	14SF	19	7	3	3
	14PB	18	8	2	2
	15SF	22	9	3	3
	21SF	18	4	3	3
	22SF	18	9	3	3
	24SF	25	11	4	4
	7PB	6	4	3	3
VA23JA20	14PB	8	5	5	5
	15SF	8	3	3	2
	21SF	23	13	11	3
	22SF	18	11	11	3
	24SF	8	6	6	6
	7PB	8	2	2	1
VA25JA52	14SF	16	7	6	6
	15SF	31	8	4	4
	21SF	16	7	3	3
	22SF	9	7	4	4
	24SF	17	9	9	2
	7PB	14	4	2	2
	EW PB	20	10	2	2

Von vier Kandidaten- α -Ketten wurden insgesamt 25 verschiedene Amplifikate zur näheren Untersuchung subkloniert. Davon wurden im Ganzen 378 Klone mittels PCR-Analyse untersucht. Von 165 Transformanden wurde Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsanalyse analysiert, wobei davon 103 Klone die gewünschte Insertionsgröße aufwiesen. Schließlich wurden hiervon 78 Sequenzen unterschiedlicher CDR3-Regionen erhalten. Als Vergleich aller sequenzierten TZR α -Ketten bei verschiedenen Patienten sind die Sequenzen der CDR3-Regionen in den Tabellen 2a - d der zwei folgenden Seiten erfasst.

Tabellen 2a - d: Sequenzen der CDR3-Regionen der TZR α -Ketten verschiedener Patienten

Zum Vergleich der verschiedenen α -Ketten der Patienten sind die CDR3-Sequenzen untereinander aufgelistet. Die Referenzsequenzen von $V\beta 1^+$ vorsortierten monoklonalen TZR α -Kandidaten-Ketten sind jeweils an erster Stelle aufgeführt (fett, blau ist die Sequenz des JA-Elements). Abweichende Nukleotide oder Aminosäuren zur Kandidaten-Kettensequenz sind jeweils grau markiert und fehlende Sequenzabschnitte mit einem Strich (-) gekennzeichnet. Führt der Einschub der N-Nukleotide zu einem Stoppkodon ist dies mit einem Stern in der Aminosäuresequenz gekennzeichnet (*). Identische Sequenzen zur Kandidaten-Kette von drei untersuchten Amplifikaten sind fett hervorgehoben. Die CDR3-Aminosäuresequenz ist komplett und die jeweils identische Nukleotidsequenz am 3'-Ende in der JA-Region ist aus Platzgründen verkürzt aufgeführt.

Die CDR3-Region ist wie folgt definiert: Beginn mit 3. AS nach dem Cystein in der konservierten V-Sequenz am 3'-Ende von VA (schwarz) bis zu einer AS vor der konservierten Sequenz innerhalb der JA-Region (blau) (X entspricht beliebiger AS): Y-L/F-C-A-X-CDR3-F-G-X-G-T

Tabellen 2a: VA3JA28

Patientennr. SFMC/PBMC	Klon Nr.	Aminosäuresequenz CDR3 von Va3nJa28	Nukleotidsequenz der CDR3-Region VA3nJa28
$V\beta 1^+$ 2.5.2.1, aReA, B27 ⁺		YFCATEGYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGGAGGG ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
14, PBMC, aReA, B27 ⁺	3.14.1	YFCA-----GAGSYQLT	TACTTCTGTG CT----- ------GGG GCTGGGAGTT
	3.14.17	YFCATAPYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGGCCCC CTACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.15.1	YFCATRRGSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACCCGTCG TGGATCTGGG GCTGGGAGTT
15, SFMC, aeA, B27 ⁺	3.15.3	YFCAT--YSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTAC----- ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.15.13	YFCAT--YSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTAC----- ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.15.17	YFCATLRGPGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACATTACG AGGTCCCGGG GCTGGGAGTT
21, SFMC, aReA, B27 ⁺	3.21.7	YFCATGH-SGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGG---G CCACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.21.8	YFCATF--SGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACCTT--- ---CTCTGGG GCTGGGAGTT
7, PBMC, gesund, B27 ⁺	3.7.1	YFCATDS--GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGGA--- ---CTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.7.2	YFCATEGYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGGAGGG ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.7.3 S-	YFCATEGYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGGAGGG ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
EHW, PBMC, gesund, B27 ⁻	3.EW.3	YFCA-AA YSGAGSYQLT	TACTTCTGTG C---GGCTGC ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.EW.4	YFCAT--YSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTAT----- ATACTCTGGG GCTGGGAGTT
	3.EW.5	YFCATDAMGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTACGGACGC GATGGGTGGG GCTGGGAGTT

Tabellen 2b: VA12JA28

Patientennr. SFMC/PBMC	Klon Nr.	Aminosäuresequenz der CDR3-Region Va12nJa28	Nukleotidsequenz der CDR3-Region VA12nJa28
$V\beta 1^+$ 2.5.2.1, aReA, B27 ⁺		YFCALSVPGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGT CCCTGGGGCT GGGAGTTAC
14, SFMC, aReA, B27 ⁺	12.14SF.16	YFCAL-LT GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGT-TGA --CTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.14SF.18	YFCAL-LT GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGT-TGA --CTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.14SF.26	YFCALSEAPSSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAGGCGCCAAGCTCTGGGGCTGGGAGTTAC
14, PBMC, aReA, B27 ⁺	12.14PB.11	YFCALSKAPSSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTAAGGCGCCAAGCTCTGGGGCTGGGAGTTAC
	12.14PB.12	YFCALSEAPSSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAGGCGCCAAGCTCTGGGGCTGGGAGTTAC
15, SFMC, aReA, B27 ⁺	12.15.13	YFCALSPHPHSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTCCACACCCTCCTCTGGGGCTGGGAGTTAC
	12.15.23	YFCALRKNSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGAAAGAACTCTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.15.25	YFCALSEAGYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAGGCGGGTACTCTGGGGCTGGGAGTTAC
21, SFMC, aReA, B27 ⁺	12.21.16	YFCALSEGRYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAGGGGAGATACTCTGGGGCTGGGAGTTAC
	12.21.25	YFCALSEATYSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAGGCGACATACTCTGGGGCTGGGAGTTAC
22, SFMC, aReA, B27 ⁺	12.22.13	YFCALS L P YSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGCCTGCCATACTCTGGGGCTGGGAGTTAC
	12.22.16	YFCALY--GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGTACGG GGCT----- GGGAGTTAC
	12.22.24	YFCALY--GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGTACGG GGCT----- GGGAGTTAC
24, SFMC, cReA, B27 ⁺	12.24.2	YFCAAS--GAGSYQLT	TACTTCTGTG CCGCCT---- --CTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.24.3	YFCALSEFRSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAATTTAGGTCTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.24.12	YFCALSEFRSGAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGAATTTAGGTCTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.24.19	YFCALSAYSAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGAGTGCTTACTCTGGGGCT GGGAGTTAC
7, PBMC, gesund, B27 ⁺	12.7.1	YFCALVS-GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGGTTT- --CTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.7.3	YFCALVS-GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGGTTT- --CTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.7.5	YFCALVS-GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGGTTT- --CTGGGGCT GGGAGTTAC
	12.7.6	YFCALVS-GAGSYQLT	TACTTCTGTG CTCTGGTTT- --CTGGGGCT GGGAGTTAC

Tabellen 2c: VA23JA20

Patientennr. SFMC/PBMC	Klon Nr.	Aminosäuresequenz der CDR3-Region Va23nJa20	Nukleotidsequenz der CDR3-Region VA23nJA20
Vβ1 ⁺ 2.5.2.1, aReA, B27 ⁺		YLCAVV SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTGGTCTC TAACGACTAC
14, PBMC, aReA, B27 ⁺	23.14.1	YLCAVRQEI*RLQAQ	TACCTCTGTG CTGTGAGGCA AGAGATC TAACGACTAC
	23.14.3	YLCAVT-NDYKLS	TACCTCTGTG CTGTAC--- TAACGACTAC
	23.14.4	YLCA--ANDYKLS	TACCTCTGTG CTG-----C TAACGACTAC
	23.14.5	YLCAVSP*RLQAQQG	TACCTCTGTG CTGTGAGCCCCTAACGACTAC
	23.14.8	YLCAVSP*RLQAQ	TACCTCTGTG CTGTGAGCCCCTAACGACTAC
15, SFMC, aReA, B27 ⁺	23.15.1	YLCAVRLQGSNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTGAGGCTTCAGGGGTC TAACGACTAC
	23.15.5	YLCAVRL*GSNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTGAGGCTTTAGGGGTC TAACGACTAC
21, SFMC, aReA, B27 ⁺	23.21.13	YLCAV-SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTG---TC TAACGACTAC
	23.21.14	YLCAV-SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTA---TC TAACGACTAC
	23.21.18	YLCAV-PNDYKLS	TACCTCTGTG CTGT---CCC TAACGACTAC
22, SFMC, aReA, B27 ⁺	23.22.8	YLCA-ATNDYKLS	TACCTCTGTG CTGCCAC--- TAACGACTAC
	23.22.2	YLCA-ATNDYKLS	TACCTCTGTG CTGCCAC--- TAACGACTAC
	23.22.11	YLCAAMGTNDYKLS	TACCTCTGTG CTGCAATGGGTACTAACGACTAC
24, SFMC, cReA, B27 ⁻	23.24.1	YLCAVR SNDYKLSK	TACCTCTGTG CTGTCCG TTC TAACGACTAC
	23.24.2	YLCAAL SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGCGCT TTC TAACGACTAC
	23.24.3	YLCAAL SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGCGCT TTC TAACGACTAC
	23.24.4	YLCAVR SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTCCG TTC TAACGACTAC
	23.24.5	YLCAVR SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTCCG TTC TAACGACTAC
	23.24.6	YLCAVR SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTCCG TTC TAACGACTAC
7, PBMC, gesund, B27 ⁺	23.7.3	YLCAVV SNDYKLS	TACCTCTGTG CTGTGGTCTC TAACGACTAC

Tabellen 2d: VA25JA52

Patientennr. SFMC/PBMC	Klon Nr.	Aminosäuresequenz der CDR3-Region Va25nJa52	Nukleotidsequenz der CDR3-Region VA25nJA52
Vβ1 ⁺ 2.5.2.1, aReA, B27 ⁺		YFCAGLGAGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGGCTGGG TGCTGGTGGT ACTAGCTAT
14, SFMC, aReA, B27 ⁺	25.14.1	YFCAGQLGWY* LWK	TACTTCTGTG CTGGGCAGCTCG GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.14.2	YACAGQLGWY*L* K	TACTTCTGTG CTGGGCAGCTCG GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.14.4	YACAGQLGWY*LW	TACTTCTGTG CTGGGCAGCTCG GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.14.6	YFCAGRFS GGTSYK	TACTTCTGTG CTGGGCGCTT CT GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.14.7	YFCAGQLGWY*LW KEG	TACTTCTGTG CTGGGCAGCTCG GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.14.8	YFCAGRFS GGTSYK	TACTTCTGTG CTGGGCGCTT CT GCTGGTGGT ACTAGCTAT
15, SFMC, aReA, B27 ⁺	25.15.2	YFCAGDPL NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGGGACCC GCT TAATGCT GGTGGTACTAG CTAT
	25.15.4	YFCAGDPL NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGGGACCC TCTC AAATGCT GGTGGTACTAG CTAT
	25.15.7	YFCAGDPL NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGGGACCC GCT TAATGCT GGTGGTACTAG CTAT
	25.15.28	YFCAGDPL NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGGGACCC GCT TAATGCT GGTGGTACTAG CTAT
21, SFMC, aReA, B27 ⁺	25.21.1	YFCAGLGAGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGCCTGGG AGCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.21.7	YFCAGLGAGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGGCTCGG TGCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.21.14	YFCAGLGAGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGGCTCGG GGCTGGTGGT ACTAGCTAT
22, SFMC, aReA, B27 ⁺	25.22.1	YFCAGRPRAGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGGCGGCC CAG GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.22.6	YFCAGN-AGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGG AAT -- - GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.22.8	YFCAGALSN NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGGGCCCTTTCAA ATAATGCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.22.9	YF-WGTPGGTSY GKLT	TACTTCTGGG GGACAC---- -- CTGGTGGT ACTAGCTAT
24, SFMC, cReA, B27 ⁺	25.24.3	YFCAGL-AGGTSY GKLT	TACTTCTGTG CTGGCCTT-- - GCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.24.10	YFCAGQL NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGGCAGTTA AAATGCTGGTGGT ACTAGCTAT
7, PBMC, gesund, B27 ⁺	25.7.12	YFCAGRAN NAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGCCGAGCT AAATGCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.7.14	YFCAGR WAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGCCGTTG GGCTGGTGGT ACTAGCTAT
EW, PBMC, gesund, B27 ⁻	25.EW.1	YFCAGPS AGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGTCCAAG CGCTGGTGGT ACTAGCTAT
	25.EW.9	YFCAGH STEAGGTSYKLT	TACTTCTGTG CTGGCATTCA ACCAGGCTGGTGGTACTAGCTAT

Die Sequenzanalyse zeigt, dass die meisten der untersuchten CDR3-Regionen die gesuchte Fragmentlänge aufzeigen oder nur eine geringe Abweichung von ein bis drei Aminosäuren aufweisen. Diese Ungenauigkeit ist auf die relativ grobe Auftrennung im Agarosegel zurückzuführen, bei der Unterschiede von einzelnen Nukleotiden nicht erkennbar sind. Es zeigt aber, dass die Vorgehensweise der Subklonierung zum Erhalt der verschiedenen CDR3-Sequenzen zu auswertbaren Sequenzen führt. Die dominanten Maxima, die bei der Spektrotypisierung sichtbar wurden, entsprechen jedoch meist nicht einer monoklonalen α -Kette, sondern bestehen aus verschiedenen Umlagerungen mit weitestgehend gleicher Anzahl an Aminosäuren. Gleiche oder strukturell ähnliche TZR α -Ketten zwischen mehreren Patienten, die auf dasselbe oder ähnliche Antigene reagieren, könnten wichtige Hinweise auf einen potentiell pathogenen TZR bei ReA-Patienten beisteuern.

Das bemerkenswerteste Ergebnis der Sequenzanalysen waren identische Sequenzen zur TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten innerhalb von drei der vier untersuchten verschiedenen CDR3-Regionen. Bei PBMC eines Gesunden (Nr. 7) wurde sowohl bei VA3JA28, als auch bei Va23JA20 die gleiche Rekombination der α -Ketten aufgespürt. Darüber hinaus zeigte sich in Synovialzellen bei ReA-Patient Nr. 21 eine zu den V β 1⁺-Synovialzellen von Patient 2.5.2.1 identische α -Kette VA25JA52.

Im Einzelnen beleuchtet, weisen die Sequenzvergleiche einige Ähnlichkeiten zu den gesuchten TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten auf. Es lassen sich auch Gleichheiten in den Sequenzen zwischen anderen Patienten finden.

Sequenzvergleich von VA3JA28

Bei den Sequenzen der α -Kette VA3JA28 ist das auffälligste Ergebnis, dass bei einer gesunden HLA-B27⁺Person (Nr. 7) in peripheren Blutzellen eine identisch rearrangierte α -Kette vorkommt, wie in Synovialzellen bei der ReA-Patientin 2.5.2.1 (siehe Tabellen 2a). Bei zwei von drei untersuchten stimmt die Sequenz auf Aminosäure- und Nukleotidenebene überein (3.7.2/3.7.3S-). Die weiteren gefundenen CDR3-Regionen anderer Patienten sind etwas kürzer, meist um ein bis zwei Aminosäuren, als die Referenzsequenz. Zwei CDR3-Regionen zweier verschiedener Patienten (14SF und 15SF) haben die gleiche Länge, weichen aber in jeweils zwei Aminosäuren an der Verknüpfungsstelle von VA3 und JA28 ab (statt EG bei V β 1⁺2.5.2.1 AP bei Nr. 3.14.17 bzw. RR bei Nr. 3.15.1).

Sequenzvergleich von VA12JA28

Die Offenlegung der α -Ketten-Sequenzen der dominanten Spitzen in der Spektrotypisierung führt beim Vergleich der VA12JA28-Kandidaten-Kette zu sehr ähnlichen, jedoch größtenteils zu nicht identischen Sequenzen (siehe Tabellen 2b). Die gleich langen Spitzen der vier Proben (14SF, 14PB, 15SF, 21SF) weisen zueinander gleich lange Sequenzen auf, die wie erwartet drei Aminosäuren länger als die Referenzlänge von V β 1⁺ 2.5.2.1 sind. Interessanterweise erscheint bei Patient Nr. 14 eine übereinstimmende TZR α -Kette sowohl in den Synovialzellen (12.14SF.26) als auch im peripheren Blut (12.14PB.12). Die zweite sequenzierte CDR3-Region von Nr.14PB (12.14PB.11) zeigt nur eine Abweichung von einer Aminosäure (K statt E) zu dieser identischen α -Kette. Dazu gleich lange Sequenzen der Patienten Nr. 15SF und Nr. 21SF stimmen mit dieser nicht überein, ähneln sich jedoch untereinander

sehr und unterscheiden sich nur in einer Aminosäure (EAGYS bei 12.15.25 versus EATIYS bei 12.21.25). Auch der Einschub EGRYS des zweiten analysierten Klons des Patienten Nr. 21 (12.21.16) ist dazu bis auf die zwei unterstrichenen Aminosäuren homolog. Das Vorkommen ähnlicher Umlagerungen der α -Ketten könnte potentiell auf funktionell entsprechende TZR hindeuten.

Die Sequenzanalyse des konformen Peakmasters in der Spektratypisierung von Patient Nr. 22 und Nr. 24 deckt für die längeren Spitzen differierende Aminosäuren auf. Für die kürzeren Peaks liegt die Verschiedenheit in zwei Aminosäuren. Bei 12.22.16 und 12.22.24 kommen die Aminosäuren LY statt AS beim anderen Patienten 12.24.2 vor. Darüber hinaus ist die gleich lange Spitze bei Pat. 14SF und Gesundem Nr. 7 in zwei Aminosäuren divergent (LT bei 12.14SF.16/12.14.18 versus VS bei der monoklonalen Sequenz der vier Klone von 12.7).

Sequenzvergleich von VA23JA20

Vorrangig ist beim Sequenzvergleich der Kandidaten-Kette VA23JA20 festzustellen, dass hier wiederum beim HLA-B27⁺ gesunden Proband eine identische rekombinierte TZR α -Kette im peripheren Blut aufgespürt wurde (23.7.3) (siehe Tabellen 2c). Jedoch konnte bei dieser Subklonierung von acht analysierten Transformandenklonen nur eine definierte Sequenz gewonnen werden, was keinen repräsentativen Umfang des Ergebnisses darstellt.

Die weitgehend monoklonalen Verschiebungen in der Spektratypisierung der Patienten 15SF, 21SF und 24SF erweisen sich in der Sequenzanalyse nicht als vollständig monoklonale Expansionen und beinhalten gleich lange jedoch voneinander abweichende Sequenzen. Vier von sechs sequenzierten Klonen der als sichtbare dominante Spitze von Patient 24SF weisen eine konforme Sequenz auf, die nur in einer Aminosäure von der gesuchten VA23-Kandidaten-Kette differiert (R bei 23.24.1/4/5/6 statt V bei V β 1⁺ 2.5.2.1). Die anderen beiden haben davon zwei ungleiche Aminosäuren (23.24.2/23.24.3). Wie in der Spektratypisierung ersichtlich ist der Vergleich der klonalen zueinander gleich langen Spitzen der Patienten 21SF und 22SF um drei Nukleotide kürzer zur Referenzlänge. Die Analyse der Sequenzen offenbarte jedoch keine zueinander identische Sequenz, was einen Rückschluss auf eine klonale α -Kette zulassen könnte. Bemerkenswert ist aber, dass bei Patient 21SF bei zwei der drei Sequenzen bis auf eine Aminosäure verkürzt eine Übereinstimmung zur VA23-Kandidaten-Kette auftritt (23.21.13/23.21.14). Mit Ausnahme der fehlenden Aminosäure Valin entsprechen sich die CDR3-Regionen. Die dritte analysierte Sequenz von 23.21.18 zeigt eine ähnliche Rekombination bei Patient 21SF, da nur die Modifikation eines Nukleotids zu einer anderen Aminosäure führte.

Sequenzvergleich von VA25JA52

Das TZR α -Ketten-Repertoire in der Spektratypisierung bei VA25JA52, deutet darauf hin, dass die dominante Umlagerung in einigen anderen Patienten auch vorkommen könnte. Die Sequenzanalyse legte jedoch bis auf eine bedeutungsvolle Ausnahme des Patienten 21SF keine identische Aminosäureabfolge in der CDR3-Region offen (siehe Tabellen 2d). Die exakt gleich langen Sequenzen zu 2.5.2.1 unterscheiden sich in zwei bis fünf Aminosäuren. Erwähnenswert ist lediglich das Auftreten von einer α -Ketten-Sequenz bei Patient 22SF, die um eine Aminosäure kürzer zur Referenzsequenz aber übereinstimmend ist (25.24.6).

Drei von drei sequenzierten TZR α -Ketten des Patienten 21SF haben die einheitliche Aminosäuresequenz homolog zu der gesuchten VA25JA52-Kandidaten-Kette. Die monoklonal

expandierte CDR3-Region aus der cDNS von Synovialzellen bei zwei Patienten könnte ein Hinweis auf die α -Kette des pathogenen TZR bei der ReA sein. Auffallend ist, dass alle vier Nukleotidsequenzen geringe Unterschiede vorweisen, die in einer exakt gleichen Aminosäureabfolge resultieren. Sie differieren jeweils an der dritten Kodonposition (Wobbel-Position). Ein unterschiedliches Rearrangement bei der Generierung der α -Ketten führte zu funktionellen TZR mit einer gleichen α -Kette identischer Aminosäuresequenz. Diese TZR α -Ketten liegen expandiert vor, was Hinweise auf die Beteiligung bei der Erkennung eines Antigens liefern könnte.

6.1.1.3 Vergleich der Sequenzen der TZR α -Kandidaten-Ketten mit veröffentlichten Sequenzen

Von besonderem Interesse erschien, ob ähnliche oder sogar identische VAJA-Umlagerungen und vor allem CDR3-Regionen der gefundenen α -Ketten-Transkripte verschiedener ReA-Patienten bei bereits veröffentlichten isolierten umgelagerten TZR-Sequenzen auftraten. TZR α -Ketten mit ähnlichen Sequenzen könnten entsprechende Antigene erkennen, was zu Hinweisen auf pathogene TZR führen könnte. Mit Hilfe des NCBI-Blast Moduls (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oder der IMGT-Datenbank wurden die hier gefundenen cDNS-Sequenzen und Aminosäuresequenzen verglichen.

Die folgenden Tabelle 3 a-e zeigen den Vergleich der Aminosäuresequenzen der CDR3-Regionen der TZR α -Kandidaten-Ketten mit den Sequenzen in der NCBI/nucleotide-Datenbank oder NCBI/protein-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> bzw. [/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)). Gegenstand der Suche war hauptsächlich die Aminosäuresequenz der CDR3-Regionen, da diese wesentlich bei der Antigenerkennung beteiligt ist. Die kompletten Nukleotidsequenzen wurden darüber hinaus bei den Kandidaten- α -Ketten (von V β 1⁺ 2.5.2.1) in die Datenbanksuche mit einbezogen. Abgesehen von den unterschiedlichen VA- und JA-Segmenten werden die Sequenzen der CDR3-Regionen unmittelbar miteinander verglichen, in den Tabellen untereinander aufgeführt und mit Angabe der Zugriffsnummer bezogen auf die NCBI-Datenbank sowie die Reaktivität des TZR, sofern angeführt, erfasst. Die Auswahlkriterien der aufgelisteten Sequenzen waren die gleiche Länge der CDR3-Regionen und eine Abweichung von nicht mehr als drei Aminosäuren der isolierten Sequenz zur geprüften Sequenz.

Tabelle 3 a-e: Vergleich der CDR3-Aminosäuresequenzen mit veröffentlichten TZR α -Ketten

Die gefundenen CDR3-Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen) der TZR α -Ketten der ReA-Patienten sind mit veröffentlichten Sequenzen (NCBI-Datenbank) verglichen und untereinander aufgelistet. Die Referenzsequenzen der TZR α -Kandidaten-Ketten (V β 1⁺ 2.5.2.1) sind jeweils an erster Stelle aufgeführt (blau ist die Sequenz des JA-Elements). Abweichende AS der Klone zur Kandidaten-Kettensequenz sind jeweils grau und abweichende AS der veröffentlichten AS-Sequenzen zu den Klon^{ReA}-Sequenzen sind gelb markiert. Die Zugriffsnummern beziehen sich auf die NCBI/protein Datenbank. Die umgelagerten VANJA-Gensegmente bzw. VaJa-Regionen und die Reaktivität der TZR - sofern publiziert – sind angegeben und identische Gensegmente zur Kandidaten-Sequenz türkis markiert.

Tabelle 3a: VA3JA28

VA3JA28 Klon ^{ReA} Nr.	AS-Sequenz der CDR3-Region mit Angabe der VaJa-Region	Reaktivität / Spezifität / Herkunft	Zugriffsnummer
V β 1 ⁺ 2.5.2.1 3.14.17 3.15.1	V α 3 YFCATEGYSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 3 YFCATAPYSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 3 YFCATRRGSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 8 YFCAASSYSGAGSYQLT J α 28	CD4 ⁺ Berylliose	AEP20471.1
	V α 22 YFCALSLYSGAGSYQLT J α 28	CD4 ⁺ Berylliose	AEP20469
	V α 6 YFCAMRDYSGAGSYQLT J α 28	Diffuses großzelliges B-Zelllymphom	ACF49241
3.21.7 3.EW.5	V α 3 YFCATGHSYGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 3 YFCAAAYSYGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 25 YFCAGYYSYGAGSYQLT J α 28	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94770
	V α 8 YFCAAPGSGAGSYQLT J α 28	B27-alloreaktive ZTL	AAA82668
3.7.1	V α 3 YFCATDSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 38 YFCAFIDSGAGSYQLT J α 28	HER2(369)-spezifisch	ACY74602.1
3.14.1	V α 3 YFCAGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 8 YFCAAGAGSYQLT J α 28	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94444.1

SEB: Staphylococcus enterotoxin B; HER2: human epidermal growth factor receptor 2

Tabelle 3b: VA7JA24

VA7JA24 Klon ^{ReA} Nr.	AS-Sequenz der CDR3-Region mit Angabe der VaJa-Region	Reaktivität / Spezifität / Herkunft	Zugriffsnummer
V β 1 ⁺ 2.5.2.1	V α 7.2 YLCAV---SWGKLQFGAGT J α 24.02	–	–
	V α 7.2 YLCAVKTTSWGKLQFGAGT J α 24.02	HSV2-spezifische ZTL	ACX42482.1
	V α 7.2 YLCAVNPDSWGKLQFGAGT J α 24.02	HSV2-spezifische ZTL	ACX42512
	n. d. YLCAVGVDSWGKLQFGAGT J α 24.02	ZTL: HLA-A2 mit Melan-A	AAN12381.1
	n. d. YLCAVTTSWGKLQFGAGT J α 24.02	TZR A6: HLA-A2 + HTLV-1 Tax	1QRN_D

HSV2: Herpes-simplex-Virus 2; HTLV-1: Humanes T-Zell-lymphotropes-Virus 1; Tax: virales Onkoprotein

Tabelle 3c: VA12JA28

VA12JA28 Klon ^{ReA} Nr.	AS-Sequenz der CDR3-Region mit Angabe der VaJa-Region	Reaktivität / Spezifität / Herkunft	Zugriffsnummer
V β 1 ⁺ 2.5.2.1	V α 12 YFCALSVPGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 8 YFCAVSVLGGAGSYQLT J α 28	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94715.1
	V α 16 YFCAVSAAPGAGSYQLT J α 28	ZTL: HLA-A2 + anti-Mage3	CAA06180.1
12.22.16 12.24.2	V α 12 YFCALYGGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 12 YFCAASGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 7 YLCAVTGGAGSYQLT J α 28	B27-alloreaktive ZTL	AAA61068
	V α 8 YFCAA-GAGSYQLT J α 28	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94444
12.24.19	V α 12 YFCALSAYSAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 9 YFCALSAYSAGSYQLT J α 28	CD4 ⁺ Berylliose	AEP20473
	V α 22 YFCALSISAGSYQLT J α 28	CD4 ⁺ Berylliose	AEP20469
	V α 8 YFCAASSYSGAGSYQLT J α 28	CD4 ⁺ Berylliose	AEP20471
	n. d. YFCALSENSGAGSYQLT J α 28	Melanozyten spezifische ZTL	AAC50315
12.22.13	V α 12 YFCALSLPYSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 22 YFCALSL-YSGAGSYQLT J α 28	CD4 ⁺ Berylliose	AEP20469
12.14SF.26 12.14PB.11	V α 12 YFCALSEAPSSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 12 YFCALSKAPSSGAGSYQLT J α 28	–	–
	V α 17 YFCAASEVVTSGAGSYQLT J α 28	MBP-spezifisch CD4 ⁺	AAA80959

MBP: Myelin-basisches Protein

Tabelle 3d: VA23JA20

VA23JA20 Klon ^{ReA} Nr.	AS-Sequenz der CDR3-Region mit Angabe der VaJa-Region	Reaktivität / Spezifität / Herkunft	Zugriffsnummer
Vβ1* 2.5.2.1 23.24.1	Vα23 YLCAVVSN ^Y NDYKLS Jα20	–	–
	Vα23 YLCAVR ^R SN ^Y NDYKLS Jα20	–	–
	Vα2 YLCAVN ^N LNDYKLS Jα20	Akute lymph. Leukämie cGVHD	ABY60726
	Vα6 YLCA ^L LGANDYKLS Jα20	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94706
23.22.11	Vα23 YLCAAMGTNDYKLS Jα20	–	–
	Vα23 YLCAVRPQNDYKLS Jα20	alloreakt. HER2(369)-spezifisch	ACY74604
	Vα10 YLCAGVPSNDYKLS Jα20	alloreakt. HER2(369)-spezifisch	ACY74600
	Vα14 YLCAMRDGNDYKLS Jα20	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94482
23.14.4 23.21.13	Vα23 YLCAVTNDYKLS Jα20	–	–
	Vα23 YLCAVSN ^Y NDYKLS Jα20	–	–
	Vα6 YLCA ^L LGNDYKLS Jα20	SEB-stimulierte CD4 ⁺	BAF94787
23.14.4	Vα23 YLCAANDYKLS Jα20	–	–
	Vα2.2 YLCAVR ^R DYKLS Jα20	B27-alloreaktive ZTL	AAA82670
	Vα2.2 YLCA ^F YDYKLS Jα20	B27-alloreaktive ZTL	AAA82658

cGVHD: chronic graft versus host disease (chronische Spender gegen Empfänger Krankheit)

Tabelle 3e: VA25JA52

VA25JA52 Klon ^{ReA} Nr.	AS-Sequenz der CDR3-Region mit Angabe der VaJa-Region	Reaktivität / Spezifität / Herkunft	Zugriffsnummer
Vβ1* 2.5.2.1 25.14.6 25.7.14 25.EW.1	Vα25 YFCAGLGAGGTSYGKLT Jα52	–	–
	Vα25 YFCAGRFSGGTSYGKLT Jα52	–	–
	Vα25 YFCAGRWAGGTSYGKLT Jα52	–	–
	Vα25 YFCAGPSAGGTSYGKLT Jα52	–	–
	Vα25 YFCAGNL ^N AGGTSYGKLT Jα52	CD1c-Lipopeptid spezifisch	ACF05611.1
	Vα25 YFCAG ^G NAGGTSYGKLT Jα52	B27-alloreaktive ZTL	AAB47364.1
	Vα10 YLCAGSNAGGTSYGKLT Jα52	snRNP-reaktiver TZR / Kollagenose	AAK17941.1
	Vα3.1 YFCADPNAGGTSYGKLT Jα52	Mykobakt. Hitzeschockp. spezifisch	AAB35076.1
	Vα22 YFCALSVAGGTSYGKLT Jα52	n.d.	AAF24079.1
	Vα13.1 YFCAVGWAGGTSYGKLT Jα52	B27-alloreaktive ZTL	AAB47377.1
	Vα17 YFCATANAGGTSYGKLT Jα52	reaktiv: zwei snRNP / Kollagenose	AAO72258.1
	Vα1.3 YFCAVSFAGGTSYGKLT Jα52	CD4 ⁺ dominantes T-Zell Epitop	CAB96912.1
	25.22.6 25.24.3	Vα25 YFCAGNAGGTSYGKLT Jα52	–
Vα25 YFCAGLAGGTSYGK Jα52		–	–
Vα3.1 YFCLSNAGGTSYGK Jα52		snRNP-reaktiver TZR / Kollagenose	AAB38320
25.22.1 25.24.10 25.7.12	Vα25 YFCAGRPRAGGTSYGKLT Jα52	–	–
	Vα22 YLCAVRPNAGGTSYGK Jα52	snRNP-reaktiver TZR / Kollagenose	AAC62083
	Vα24 YICVVRPNAGGTSYGK Jα52	CD4 ⁺ CD8 ⁻ doppelnegative T-Zellen	PH1783
	Vα25 YFCAGQLNAGGTSYGK Jα52	–	–
	Vα25 YFCAGRANAGGTSYGK Jα52	–	–
n.d.	YFCALLSNAGGTSYGKLT Jα52	ZTL in Melanoma	AAB31564

snRNP: small nuclear ribonucleoprotein particles; n.d.: nicht definiert

Der Vollständigkeit halber ist noch der Vergleich für die sechste Kandidaten-Kette VA8JA7 zu erwähnen: es findet sich eine veröffentlichte α-Ketten-Sequenz mit der gleichen VA8JA7-Umlagerung, jedoch mit einem um zwölf Aminosäuren außerordentlich längeren Einschub innerhalb der CDR3-Region (TETQPEDSAVYFCAASIPAGEGNNRLAFGK GK, Zugriffsnummer BAF94431). Diese α-Kette wurde bei SEB-stimulierten CD4⁺-T-Zellen auf Einzelzellenebene nachgewiesen, von denen sich auch einige hier aufgeführten CDR3-Regionen finden (siehe bei VA3JA28, VA12JA28, VA23JA29) (Ozawa et al., 2008).

Insgesamt lässt sich beim Vergleich der TZR^{ReA} Kandidaten- α -Ketten mit veröffentlichten Sequenzen von rearrangierten TZR α -Ketten feststellen, dass keine identische CDR3-Region bisher publiziert wurde. Eine Umlagerung gleicher VA- und JA-Gensegmente der isolierten TZR α -Ketten findet sich in der Literatur bei drei Kandidaten-Ketten (VA7, VA23 und VA25; jeweils türkis markiert in Tabelle 3b, d, und e.).

Das Transkript VA7JA24.02 wurde bei zwei veröffentlichten α -Ketten nachgewiesen, deren TZR auf ZTL exprimiert werden, die spezifisch durch ein Antigen von HSV2 (Herpes-Simplex-Virus 2) aktiviert werden (Dong et al., 2010). Allerdings ist dieses Transkript um drei bzw. vier Aminosäuren länger als das der α -Kandidaten-Kette.

Eine isolierte Umlagerung VA23JA20 konnte bei alloreaktiven HER-2 spezifischen TZR bei therapeutischen T-Zell-Transfer nachgewiesen werden (Liang et al., 2010). Diese CDR3-Region weist jedoch auch eine Abweichung von vier Aminosäuren zur gesuchten Kandidaten-Kette bzw. ReA-Sequenz (Klon 23.22.11) auf.

Nur jeweils in zwei Aminosäuren hingegen divergieren zwei verschiedene isolierte α -Ketten-Transkripte VA25JA52 von der Kandidaten-Sequenz. Dieses Ergebnis scheint das bedeutungsvollste zu sein, da die CDR3-Regionen exakt gleiche Längen aufweisen und die ähnlichen Aminosäuren statt LG entweder NL oder GN auftreten und letztere Sequenz für einen HLA-B27 alloreaktiven TZR gefunden wurde.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in veröffentlichten Aminosäuresequenzen keine rearrangierte α -Kette gefunden wurde, die zu einer TZR^{ReA}-Kandidaten-Kette identisch ist.

6.1.2 TZR α -Ketten in Einzelzellen von ReA Patientin 006-2.5.2.1

Die Charakterisierung eines pathogenen Rezeptors von zytotoxischen T-Zellen kann nur durch die Kenntnis der Paarung einer TZR α -Kette mit TZR β -Kette auf einer einzelnen Zelle erfolgen. Deshalb war es von besonderem Interesse Einzelzellen von V β 1⁺ vorsortierten Synovialzellen der Patientin 006-2.5.2.1 zu untersuchen, in denen die monoklonal expandierten α -Ketten vorlagen und anhand derer die Definition der Kandidaten- α ^{ReA}-Ketten in dieser Arbeit erfolgte (siehe Abschnitt 4.1.6, S. 28).

Im Labor waren bereits 16 Einzelzellen nach Expansion der V β 1⁺ T-Zellen im Zuge der Sortierung und Kultivierung der Synovialzellen abgelegt worden und bei -80°C gelagert (Sarah Kubis). Die TZR-Ketten dieser Einzelzellen sollten bestimmt werden. Im Rahmen der Diplomarbeit von Petra Prinz wurden diese Einzelzellen 2.5.2.1 mit einer Mehrstufen-PCR auf die V β 1-Kette sowie direkt auf die sechs Kandidaten- α -Ketten hin untersucht (Prinz, 2006). Bei neun Zellen konnten jeweils die VB1JB2.3-Umlagerung eindeutig mit einer Sequenzanalyse (TZR β ^{HLA-B27}) nachgewiesen werden, wobei die VA-Amplifikationen der α -Kandidaten-Ketten zu einem mehrdeutigen Ergebnis geführt hatte. Deshalb war es von Belang, welche α -Ketten mit der V β 1-Kette exprimiert werden und ob auf Einzelzellebene die monoklonalen α -Kandidaten-Ketten ebenfalls aufzufinden sind. Außerdem sollte dadurch die Methode einer Mehrstufen Einzelzell-PCR zur Amplifikation aller theoretisch vorkommenden α -Ketten etabliert werden.

6.1.2.1 Mehrstufen- α -Ketten-PCR bei neun Einzelzellen von $V\beta 1^+$ SFMC 2.5.2.1

Die neun Einzelzellen mit der alloreaktiven $TZR\beta^{HLA-B27}$ wurden mit Hilfe einer Mehrstufen-PCR auf ihre $TZR\alpha$ -Kette hin untersucht. Die genaue Durchführung ist im Methodenteil in Abschnitt 5.1.5.4 (S. 44ff) beschrieben. Dabei erfolgten im ersten Schritt gleichzeitig eine cDNS-Synthese mit einer Prä-Amplifikation des spezifischen VB1-Gensegments sowie aller vorhandenen Transkripte der α -Kette. Im zweiten Schritt wurde eine so genannte Multiplex-PCR zur Amplifikation aller 32 VA-Gensegmente durchgeführt. Die Spezifität wurde im dritten Amplifikationsschritt erhöht, indem dafür die Oligonukleotide für die VA-Gensegmente gruppiert wurden und die Amplifikation somit in fünf verschiedenen Reaktionen aufgeteilt wurde.

Das Ergebnis dieser Mehrstufen-PCR zeigte (nicht dargestellt), dass in vier Einzelzellen (Nr. 1, 8, 9, 16) jeweils die α -Ketten innerhalb der Gruppe für die sechs Kandidaten- α -Ketten amplifiziert wurden. Zwei Einzelzellen hingegen zeigten ein Fragment bei der Amplifikation einer anderen Oligonukleotid-Gruppe (Gruppe 2 bei Einzelzelle Nr. 2 und 12). Bei der Amplifikation der Einzelzelle Nr. 10 konnte kein Fragment nachgewiesen werden und die Einzelzellen Nr. 13 und 15 zeigten ein schwaches Amplifikat in der Gruppe 5.

Um die PCR-Produkte zweifelsfrei den verschiedenen VA-Gensegmenten zuordnen zu können, wurden die sechs eindeutig amplifizierten Fragmente mit dem TOPO TA Cloning Kit in den pCR II-Vektor ligiert und in Bakterien (TOP10) transformiert. Das Vorhandensein einer Insertion bei jeweils mindestens 15 Transformandenkolonien wurde mit einer PCR mit dem M13-Primerpaar geprüft und die Plasmid-DNS von Bakterienklonen der richtigen Länge sequenziert. Insgesamt führte die Analyse bei zwei Klonen von Einzelzelle Nr. 1 (1-10) und Einzelzelle Nr. 9 (9-3) zu einer auswertbaren Sequenz. Bei den anderen untersuchten Transformandenklonen konnte entweder keine Insertion nachgewiesen werden, oder die Sequenzierungsergebnisse waren trotz mehrmaligen Versuchens nicht auswertbar. Die Sequenzen der α -Kette und der β -Kette der Einzelzellen werden im nächsten Abschnitt 6.1.2.2 aufgeführt.

6.1.2.2 Analyse der Sequenzen der $TZR\alpha$ - und β -Ketten der Einzelzellen

Die Sequenzen der β -Kette der neun Einzelzellen von $V\beta 1^+CD8^+$ ReA-Synovialzellen 2.5.2.1 wurden nach dem Prä-Amplifikationsschritt der Mehrstufen-PCR anhand des PCR-Produktes von VB1JB2.3 analysiert (P. Prinz). Dabei zeigte sich, dass alle VB1JB2.3-Amplifikate die CDR3-Umlagerung der alloreaktiven $TZR\beta^{HLA-B27}$ -Kette (CASSVGTSGTDTQ) aufwiesen. Diese β -Kette wurde als alloreaktiv gegen HLA-B27 beschrieben (Barber et al., 1996, Zugriffsnummer U39127). Zu erwarten wäre jedoch die Konsensussequenz der kanonischen $TZR\beta^{ReA}$ -Kette (CASSVGVYSTDTQ) gewesen, da diese nach der CDR3-Spektratypisierung in den Ausgangszellen der Synovialflüssigkeit ursprünglich nachgewiesen wurde (May et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass hauptsächlich $V\beta 1^+$ T-Zellen mit der $TZR\beta^{HLA-B27}$ -Kette expandiert wurden und das ursprüngliche TZR -Repertoire der Synovialzellen nicht in den Einzelzellen wiedergegeben wurde.

Die Eingrenzung der Analyse durch die spezifischen Amplifikationen der sechs Kandidaten- α -Ketten sollte mit Hilfe der Multiplex-PCR aller VA-Gensegmente umgangen werden. Es sollte mittels einer Amplifikation aller theoretisch existierenden TZR α -Ketten geprüft werden, ob in den Einzelzellen eine von den Kandidaten-Ketten abweichende α -Kette vorliegt. Vorrangig wurden α -Ketten-Kandidaten amplifiziert und ein auswertbares Ergebnis der Sequenzierung ergab bei zwei Einzelzellen Nr. 1 und 9 eine Übereinstimmung in der Sequenz der α -Kette sowohl in der Nukleotid- als auch in der Aminosäuresequenz. Die α -Kette der zwei Einzelzellen entspricht VA12JA28 der monoklonalen α -Kandidaten-Kette, wie sie auch in der Gesamt-V β 1⁺-cDNS auftrat. Die CDR3-Region ist VA12-YFCALSVPGAGSYQLT-JA28).

Das Ergebnis der Mehrstufen-PCR zur Analyse der TZR α -Ketten bestätigt, dass auch auf Einzelzellebene hauptsächlich nur die bereits bekannten α -Kandidaten-Ketten in den V β 1-vorsortierten Synovialzellen 2.5.2.1 nachgewiesen werden konnten, analog zum Befund der monoklonalen α -Ketten der Gesamt-cDNS. Zwei Einzelzellen weisen die mit der Kandidaten-Kette identische Sequenz VA12JA28 auf. Gezeigt werden konnte außerdem, dass die Methode der Mehrstufen-PCR grundsätzlich zur Charakterisierung der mit der bekannten V β 1-Kette gepaarten α -Ketten geeignet ist und auch auf weitere Einzelzellen angewendet werden könnte.

Aus Mangel an weiterem Material von Einzelzellen von 2.5.2.1 Synovialzellen sowie von neuen Synovialzellen aus ReA-Patienten zur Analyse eines breiteren Spektrums konnte diese Versuchsreihe nicht fortgeführt werden.

6.2 Herstellung von Expressionsvektoren für TZR $\alpha\beta$ -Kandidaten-Ketten

Zur Identifizierung eines möglichen arthritogenen Peptids sollten T-Zelllinien etabliert werden, die nur eventuell ReA-pathogene TZR exprimieren. Geeignet dafür ist die T-Zell-Hybridomzelllinie aus der Maus 58 $\alpha\beta^-$, die keinen endogenen TZR enthält. Um stabile Transfektanten von den gefundenen monoklonal expandierten TZR α -Ketten-Kandidaten mit der klonotypischen TZR β^{ReA} -Kette und der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette zu generieren, war es nötig die entsprechenden TZR-cDNS-Sequenzen der rekombinierten α -Ketten und der β^{ReA} -Kette zu isolieren und in geeignete Expressionsvektoren zu klonieren.

Die in den anschließenden Abschnitten beschriebene Isolierung und Klonierungen umfassen folgende Schritte im Überblick zusammengefasst: Die verwendeten eukaryotischen Expressionsvektoren waren RSV5hygro für die sechs TZR α -Kandidaten-Ketten sowie RSV5neo für die zwei TZR β -Ketten. In diesen Expressionsvektoren waren bereits volle Länge cDNS-Sequenzen von TZR α - oder β -Ketten ab dem Leader- (L) bzw. Signalpeptid (LVAJACA bzw. LVBjBCB;) einkloniert (bezogen von K. Dornmair). Nach der Isolierung der vollen Länge 5'-cDNS-Sequenz kodierend für LV(D)JC konnten die variablen Bereiche über die Restriktions-schnittstellen *Sal* I am Anfang der variablen Region und *Pvu* II bzw. *Bgl* II zu Beginn der konstanten Region gegeneinander ausgetauscht werden. Im Vektor RSV5hygro

ist die CA-Region ab der *Pvu* II-Schnittstelle (*Pvu* II/*Bam* HI Fragment) bereits enthalten, was zu einer Komplettierung der vollen Länge der kodierenden TZR α -cDNS-Sequenzen führt. Da RSV5neo eine zusätzliche *Bgl* II-Erkennungssequenz enthält, war noch eine Zwischenklonierung der LVB1DJB2.3-Insertion über *Bgl* II in Vektor pBRdel nötig, wobei das Gesamt-Fragment LVB1DJB2.3CB über *Sal* I /*Bam* HI in RSV5neo umkloniert werden konnte.

Die Vektoren sind mit Abbildungen schematisch im Anhang Abschnitt 9.3 (siehe S.151f) und die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der TZR α -Kandidaten-Ketten mit Kennzeichnung der Oligonukleotidbindestellen sind im Anhang 9.5 (siehe S. 153) aufgeführt.

6.2.1 Isolierung der vollen Länge cDNS der sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten

Die Analyse der TZR α -Ketten von V β 1⁺-sortierten Synovialzellen einer ReA-Patientin 006-2.5.2.1 in der VA-CA-CDR3-Spektratypisierung führte zur Charakterisierung von sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten (siehe Abschnitt 4.1.6). Die monoklonal expandierten α -Ketten wurden mit 5'-VA-Oligonukleotiden nachgewiesen, die innerhalb der spezifischen VA-Regionen binden (vgl. Abbildung 5, S. 43 im Methodenteil für schematische Primerbindestellen). Zur Expression von funktionellen TZR-Ketten war es nötig die kompletten Sequenzen der sechs LVAJA-Transkripte zu rekonstruieren.

Für die Isolierung der vollen Länge α -Ketten-Transkripte wurde die Gesamt-RNS von V β 1⁺-Synovialzellen 006-2.5.2.1 in cDNS umgeschrieben und in eine RT-PCR eingesetzt. Für die Amplifikationen von LVAJACA wurden sechs Oligonukleotide eingesetzt, die jeweils spezifisch am 5'-Ende des Leader-Peptids der verschiedenen TRAV-Regionen binden (TRAV3L, TRAV7L, TRAV8L, TRAV12L, TRAV23L, TRAV25L). Die 5'-Primer trugen jeweils eine *Sal* I-Schnittstelle zur Klonierung in den Vektor RSV5hygro sowie eine Kozak-Konsensussequenz vor dem Startkodon zur effektiven Bindung der Ribosomen an die mRNS-Sequenzen bei der Translation (ein Purin an Nukleotidposition -3 vor dem Startkodon; Kozak, 1987a; Kozak 1989). Als 3'-Primer diente jeweils das Oligonukleotid TCRAC, das 48 bp nach 5'-Ende der CA-Region bindet. Die zur Klonierung wichtige *Pvu* II-Schnittstelle befindet sich in der CA-Region 13 bp vor dem 3'-Primer TCRAC. Für die RT-PCR wurde der FastStart High Fidelity PCR Kit verwendet, um fehlerhafte Amplifikate zu vermeiden, da ein zusätzliches Korrekturleseprotein die fehlende 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase ersetzt. Der Erfolg der Amplifikationen wurde durch Auftrennung der Fragmente (450 bp - 490 bp) im Agarosegel nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt).

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits wurden je 1/10 oder 1/5 der PCR-Produkte in den pCR II-Vektor ligiert und anschließend in die kompetenten Bakterien TOP10F' transformiert. Das M13-Primerpaar wurde zur Analyse der resultierenden Transformandenklone herangezogen und mindestens bei vier ausgewählten positiven Klonen mit richtiger Insertionslänge Plasmid-DNS je Subklonierung isoliert. Mit der Wahl geeigneter Restriktionsanalysen wurden jeweils die korrekte Länge und die Richtigkeit der VAJA-Insertion bestätigt. Die korrekten Längen wurden zunächst mit den Restriktionsenzymen *Sal* I und *Pvu* II bestimmt. Zusätzlich dienten zum Nachweis der richtigen Insertionen unterschiedliche Restriktionen mit der Analyse verschiedenlanger Fragmente. Die verwendeten Restriktionsenzyme waren bei LVA3JA28 *Acc* I, bei LVA7JA24 *Kpn* I, bei LVA8JA7 *Ava* II, bei LVA12JA28 *Acc* I, bei

LVA23JA20 *Sca* I und bei VA25JA52 *Hinc* II. Konnten die erwarteten Fragmentgrößen jeweils bestätigt werden, wurde Plasmid-DNS positiver Klone sequenziert, um Mutationen in der Sequenz auszuschließen.

Nur LVAJA-Insertionen, die eine korrekte Sequenz sowie die richtige Orientierung im pCR II-Vektor aufwiesen, wurden weitergeführt (Klone VA3.17, VA7.3, VA8.2a, VA12.5, VA23.5, VA25.7). Die Sequenzen der verwendeten Klone waren fehlerfrei und stimmten exakt mit denen der klontypischen TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten überein. Nur bei Klon VA8.2a trat eine G-Insertion vor dem Startkodon ATG bedingt durch ein fehlerhaftes Oligonukleotid auf, was keinen Einfluss auf den Leserahmen hat (5'-GTCGACAGGGATG). Außerdem konnte von der LVA25JA52-Subklonierung lediglich mehrmals die Sequenz von Klon VA25.7 isoliert werden. Diese zeigt eine Abweichung von zwei Nukleotiden zur VA25JA52-Kandidaten-Kette in der CDR3-Region. Da es sich um stille Mutationen (CTAGGG in Klon VA25.7 statt CTGGGT) oder wahrscheinlich um unterschiedliche N-Nukleotide an der V-J-Verknüpfungsstelle mit jedoch gleicher Aminosäuresequenz (Leucin und Glycin) handelt, wurde dieser Klon weitergeführt.

Die LVAJACA-Insertionen der drei Kandidaten-Ketten von LVA3JA28, LVA7JA24 und LVA12JA28 im pCR II-Vektor konnten direkt im nächsten Schritt in den Expressionsvektor in den veränderten RSV5hygro-Vektor RSVhygro_leer über *Sal* I und *Pvu* II umklont werden (siehe Abschnitt 6.2.2.2, S. 79f). In den VA-Regionen der anderen drei Kandidaten-Ketten befindet sich jedoch eine (bei LVA8JA7 und bei LVA23JA20) bzw. zwei (bei LVA25JA52) zusätzliche *Pvu* II-Schnittstellen, die bei der Umklonierung stören würden. Ihre Sequenzen konnten gezielt über den Austausch einzelner Nukleotide in eine stille Mutation verwandelt werden.

Mit Hilfe des QuikChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (siehe Mutagenese-PCR im Methodenteil Abschnitt 5.1.5.2, S. 41) wurde mit zueinander komplementären Primern ein Nukleotid ohne Veränderung des Leserasters ausgetauscht (siehe Oligonukleotide Abschnitt 4.1.3, S. 25 sowie Sequenzen im Anhang 9.5, S. 153). Bei LVA8JA7 des Klons VA8.2a wurde an Position 54 CTG in CTT und bei LVA23JA20 des Klons VA23.5 an Position 51 CTG in CTC verändert. Nach Transformation der Mutagenese-Ansätze in ultrakompetente XL10-Gold Bakterien wurden die Transformandenkolonien mit den Primerpaaren TRAV8L-TCRAC oder TRAV23L-TCRAC auf richtige Längen der Insertionen analysiert. Von positiven Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert, nochmals im *Eco* RI - Verdau die richtige Insertionslänge bestätigt und anschließend sequenziert. Die weitergeführten Klone mit richtiger Sequenz wurden mit M8.4 und M23.3 bezeichnet.

Die zwei zu verändernden Sequenzen der *Pvu* II-Schnittstellen von LVA25JA52 wurden in zwei aufeinander folgenden Schritten wie oben beschrieben durchgeführt (die PCR-Analyse der Transformanden erfolgte mit dem Primerpaar TRAV25L-TCRAC). Zum einen wurde an Position 48 CAG in CAA substituiert (Klon M1.25.1) und nach fehlerfreier Sequenzierung im zweiten Schritt die Position 75 von CTG in CTC verändert (Klon M2.25.2).

Die volle Länge cDNS-Sequenzen LVAJACA der sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten konnten isoliert werden und nach Entfernen zusätzlicher *Pvu* II-Schnittstellen anschließend aus dem pCR II-Vektor ausgeschnitten und in den Expressionsvektor RSV5hygro umklont werden.

6.2.2 Klonierung in den Expressionsvektor RSV5hygro

6.2.2.1 Veränderung des Expressionsvektors RSV5hygro in RSVhygro_leer

Bevor die rekombinierten LVAJA-Sequenzen der TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten in den Expressionsvektor RSV5hygro einkloniert werden konnten, wurde das ursprünglich vorhandene LVAJA-Element im Vektor RSV5hygro entfernt. Es handelte sich um die α -Kettensequenz von LVA22JA35 (Zugriffsnummer X57531, Giegerich et al., 1992). Der ursprüngliche Vektor RSV5hygro wurde in RSVhygro_leer verändert.

Zum Erhalt der Sequenz der Schnittstellen *Sal* I und *Pvu* II wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide RSVhygro_for und RSVhygro_rev mit entsprechenden Erkennungssequenzen, die mit Phosphatgruppen am 5'-Ende modifiziert wurden und mit deren Hilfe eine singuläre *Eco* RV-Schnittstelle in den Vektor eingefügt wird, aneinander angelagert. Dieses doppelsträngige DNS-Fragment mit überhängenden Enden wurde in den mit *Sal* I/*Pvu* II geschnittenen Vektor RSV5hygro ligiert und in Bakterien transformiert. Zur PCR-Analyse diente das Primerpaar RSVhygro_for gegen TCA4 im CA-Element. Die Plasmid-DNS der Transformanden konnte durch Linearisierung mit der eingefügten singulären *Eco* RV-Schnittstelle überprüft werden. Eine Sequenzierung bestätigt den fehlerfreien Vektor RSVhygro_leer. Im Anhang zeigt die Abbildung 23 die Nukleotidsequenzen und Primerbindestellen der Klonierungstelle des Vektors RSVhygro_leer (siehe S. 150).

6.2.2.2 Klonierung der LVAJA-Sequenzen in RSV5hygro

Die cDNS-Sequenzen LVAJACA der sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten im Subklonierungsvektor pCR II (siehe Abschnitt 6.2.1) wurden über forciertes Klonieren mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Sal* I und *Pvu* II in den Expressionsvektor RSVhygro_leer umkloniert. Die Doppelrestriktionsansätze wurden auf Vollständigkeit getestet und der Vektor RSVhygro_leer mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die 409 bp bis 449 bp großen *Sal* I-*Pvu* II-Fragmente wurden jeweils in einem präparativen Agarosegel vom übrigen Plasmid pCR II abgetrennt, isoliert und gereinigt und die jeweiligen DNS Konzentrationen durch Agarosegelelektrophorese bestimmt. Die Ligationsprodukte der LVAJACA-Insertionen in den Expressionsvektor wurden jeweils in DH5 α Subcloning Efficiency-Bakterien transformiert. Die resultierenden Transformanden wurden auf das Vorhandensein der Insertion anhand einer PCR unter Verwendung des Primers Hygro_LTR, der im RSVhygro-Vektor strangaufwärts vor der *Sal* I-Schnittstelle vor der einklonierten LVAJA-Region bindet, und des 3'-Primer TCA4 in der CA-Region getestet. Von positiven Transformandenklonen wurde Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Sal* I und *Pvu* II oder *Sal* I und *Bam* HI, das am 3'-Ende der CA-Region schneidet, konnten in sämtlichen Klonen Insertionen der erwarteten Größen nachgewiesen werden. Für die weiteren Versuche wurden die Expressionsvektoren mit Klonnummer H3.10 (LVA3JA28CA), H7.4 (LVA7JA24CA), H8.1 (LVA8JA7CA), H12.12 (LVA12JA28CA), H23.3 (LVA23JA20CA) und H25.17 (LVA25JA52CA) verwendet, die jeweils die cDNS-Sequenzen aller sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten in RSV5hygro beinhalten.

6.2.3 Klonierung der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette in RSV5neo

Ein Expressionsvektor RSV5neo der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit generiert. Diese Sequenz der β -Kette wurde als alloreaktiv gegen HLA-B27 nachgewiesen und ihre CDR3-Region weist die Aminosäuresequenz VB1-CASSVGTSGTDTQYF-JB2.3 auf (Barber et al., 1996; Zugriffsnummer U39127). Sie weicht von der kanonischen ReA-TZR β -Konsensussequenz VB1-CASSVG(V/I/L)(Y/F)STDTQYF-JB2.3 in drei Aminosäuren ab (Dulphy et al., 1999; May et al., 2002; Sequenzen im Anhang unter Abschnitt 9.5). Die volle Länge cDNS-Sequenz der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette wurde bisher noch nicht isoliert. Trotz Nachweis der klontypischen β -Kette VB1-CASSVGVYSTDTQYF-JB2.3 der Patientin 006-2.5.2.1 über V β 1-CDR3-Spektratypisierung (Zugriffsnummer AF274783) erwies sich die Isolierung der Sequenz der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette aus cDNS von V β 1⁺ Synovialzellen von Patient 2.5.2.1 unerwartet kompliziert und sollte daher in dieser Arbeit über eine Mutagenese-PCR mit Hilfe der klonierten Sequenz der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette erfolgen (Bezeichnung F2.5 von LVB1D2JB2.3^{HLA-B27} in RSV5neo).

Um die LVB1JB2.3^{ReA}-Sequenz der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette zu erhalten, erfolgte die Mutagenese des Plasmids F2.5 in drei PCR-Reaktionen, mit ausgesuchten Primern, die sieben betreffende Nukleotide in der CDR3-Sequenz verändern. Nach der Amplifikation mit den Primerpaaren V β 1neu/ReA β 1-3' sowie ReA β 1-5'/BC-290_268, wurden diese beiden PCR-Produkte in einer dritten Reaktion mit den äußeren Oligonukleotiden V β 1neu und BC-290_268 zu einem Amplifikat mit einer Länge von 262 bp vereinigt.

Das Amplifikat wurde in den pCR II Vektor subkloniert, die resultierenden Transformanten mit dem M13-Primerpaar auf das Vorhandensein einer Insertion getestet und durch einen Restriktionsverdau der Plasmid-DNS mit dem Enzym *Acc* I, das nur im D-Element der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette (LVB1JB2.3^{ReA}) schneidet, unterschieden und die korrekte Sequenz durch eine Sequenzierung sichergestellt.

Mit Hilfe der singulären Restriktionsschnittstellen für *Sac* I und *Xho* I konnte anschließend gezielt die CDR3-Region in RSV5neo ausgetauscht werden. Das 106 bp große *Sac* I-*Xho* I-Fragment LVB1JB2.3^{ReA} wurde in den Vektor F2.5 mit Kompetition der ursprünglichen LVB1D2JB2.3^{HLA-B27}-Insertion ligiert. Zur Unterscheidung der Transformanten mit unterschiedlichen Insertionen von LVB1JB2.3^{ReA} und LVB1D2JB2.3^{HLA-B27} diente die *Acc* I-Schnittstelle im D-Element von LVB1JB2.3^{ReA}. Zur Verifizierung wurden die positiven Klone sequenziert und Klon neo^{ReA}16.1 wurde weitergeführt.

Dementsprechend standen die Expressionsvektoren RSV5neo mit zwei verschiedenen rekombinanten β -Ketten zur Verfügung mit voller Länge cDNS sowohl von der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette (Klon F2.5 mit LVB1D2JB2.3^{HLA-B27}) als auch von der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette (Klon neo^{ReA}16.1 mit LVB1JB2.3^{ReA}). Zusammen mit den hergestellten TZR α -Ketten-Kandidaten in Expressionsvektoren (Abschnitt 6.2.1 und 6.2.2) konnten die β -Ketten im weiteren Verlauf zu vollständigen rekombinanten T-Zell-Rezeptoren ausgebildet auf der Zelloberfläche exprimiert und auf ihre Funktionalität, Spezifität und Reaktivität analysiert werden.

6.3 Charakterisierung und funktionelle Analysen der TZR^{ReA}-Kandidaten

Die Ausbildung zu funktionellen TZR-Komplexen der sechs isolierten TZR α -Kandidaten-Ketten mit der klontypischen TZR β ^{ReA}-Kette oder der alloreaktiven TZR β ^{HLA-B27}-Kette, sollte in einem effizienten Expressionssystem untersucht werden, um schließlich anhand der potentiell pathogenen TZR Hinweise auf ein mögliches arthritogenes Antigen zu erlangen. Es sollten dafür T-Zelllinien mit potentiell expandierten pathogenen TZR-Kandidaten der ReA etabliert werden, um zu klären oder einzuschränken, welche TZR α -Kandidaten-Kette mit der TZR β ^{ReA}-Kette assoziiert ist. Die α - und β -Ketten sollten rekombinant exprimiert, auf der Zelloberfläche nachgewiesen und die Zellen mit dem humanen CD8-Korezeptor versehen werden, um im Anschluss ihre Funktionalität und Aktivierbarkeit durch den Nachweis der IL-2-Produktion aufzuzeigen. Die stabilen alloreaktiven TZR β ^{HLA-B27}-Transfektanten sollten auf eine mögliche HLA-B27-Alloreaktion unabhängig der korrespondierenden α -Ketten untersucht werden. Die klontypischen TZR β ^{ReA}-Transfektanten sollten für die Suche nach dem arthritogenen Antigen im Kontext von HLA-B27 verwendet werden.

6.3.1 Etablierung stabiler Transfektanten der TZR^{ReA}-Kandidaten

Für die Etablierung stabiler Transfektanten mit rekombinanten TZR^{ReA}-Molekülen war die Maushybridomzelllinie 58 α β ⁻ ohne endogenen TZR α β -Ketten geeignet (Letourner und Malissen, 1989). In den Hybridomzellen können nur unvollständige Transkripte einer unproduktiven β -Ketten-Rekombination und ein α -Ketten-Transkript mit einem Pseudogen-VA-Segment nachgewiesen werden und darum können keine Hybridmoleküle aus endogenen und rekombinanten TZR-Untereinheiten entstehen sondern nur TZR aus α - und β -Ketten nach Transfektion entsprechender Expressionsvektoren. Zusätzlich enthalten die verwendeten 58 α β ⁻ Zellen das humane CD4-Molekül und die ζ -Kette des murinen CD3-Komplexes. Die murine ζ -Kette dient der besseren Stabilität bei einem spontanen Verlust der endogenen ζ -Kette und stellt die effiziente Signalweiterleitung sicher (Blank et al., 1993).

6.3.1.1 Kotransfektion der Expressionsvektoren für TZR α und β -Ketten in das 58 α β ⁻ T-Zell-Hybridom

Das 58 α β ⁻-T-Zell-Hybridom wurde jeweils mit den Expressionsvektoren RSV5hygro für die sechs TZR α -Kandidaten-Ketten sowie jeweils mit RSV5neo für die klontypische TZR β ^{ReA}-Kette oder der alloreaktiven TZR β ^{HLA-B27}-Kette mit Elektroporation kotransfiziert. Zur stabilen Expression der TZR-Moleküle durch Integration der cDNS-Sequenzen ins Genom der Zellen wurden die Expressionsvektoren jeweils vor der Elektroporation linearisiert. Bei den Expressionsvektoren RSV5hygro mit inserierten cDNS-Sequenzen der α -Kette erfolgte die Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *Xmn* I und bei RSV5neo mit *Nde* I. Der Erfolg und

die Vollständigkeit der linearisierten Vektoren wurden auf einem Agarosegel getestet und die Vektoren wurden gereinigt und präzipitiert in die Kotransfektion eingesetzt. Die genaue Durchführung der Elektroporation ist im Methodenteil in Abschnitt 5.3.3 (S. 52) beschrieben. Es wurden die folgenden 12 verschiedenen Kotransfektionen in das 58 α - β -T-Zell-Hybridom durchgeführt:

1-V α 3	VA3JA28 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo
2-V α 7	VA7JA24 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo
3-V α 8	VA8JA7 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo
4-V α 12	VA12JA28 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo
5-V α 23	VA23JA20 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo
6-V α 25	VA25JA52 in RSV5hygro + VB1JB2.3 ^{ReA} in RSV5neo
7-V α 3	VA3JA28 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo
8-V α 7	VA7JA24 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo
9-V α 8	VA8JA7 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo
10-V α 12	VA12JA28 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo
11-V α 23	VA23JA20 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo
12-V α 25	VA25JA52 in RSV5hygro + VB1D2JB2.3 ^{HLA-B27} in RSV5neo

Nach der Kotransfektion und zwei bis drei Wochen Doppelsektion mit den Antibiotika G418 und Hygromycin B, konnten bei jedem Ansatz resistente Einzelklone isoliert und expandiert werden. Die Zellklone wurden jeweils auf die TZR-Oberflächenexpression analysiert.

6.3.1.2 Charakterisierung der TZR-Expression

Ein Nachweis der TZR-Expression auf der Zelloberfläche erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit einem direkt-markierten Antikörper gegen die ϵ -Kette des Maus-CD3-Komplexes (mCD3 ϵ). Der CD3-Komplex wird nur mit korrekt gepaarten TZR α - und β -Ketten exprimiert (Hall et al., 1991). Deshalb gilt eine Anfärbung des CD3-Moleküls als Beweis, dass in dem Maus TZR-Hybridom die humanen rekombinanten α - und β -Untereinheiten produziert werden und ein korrekt assemblierter humaner TZR im Komplex mit endogenen murinen CD3-Molekülen an der Oberfläche erscheint. Der Erfolg der Kotransfektionen wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen die humane $V\beta$ 1-Kette überprüft. Für die TZR α -Ketten sind keine verfügbar. Je acht bis zehn der selektionierten und expandierten Zellklone wurden untersucht, wobei je zwei Zellklone von jedem Transfektionsansatz mit der stärksten TZR-Expression weitergeführt wurden.

Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in Abbildung 10 dargestellt. Sie zeigt jeweils den Klon mit der stärksten TZR-Expression aller positiven TZR-Transfektanten von der klontypischen TZR β ^{ReA}-Kette (1-V α 3, 2-V α 7, 4-V α 12, 5-V α 23 und 6-V α 25). Die TZR-Transfektanten mit den gleichen α -Ketten und der alloreaktiven TZR β ^{HLA-B27}-Kette zeigen eine vergleichbare, ebenfalls positive Oberflächenexpression (7-V α 3, 8-V α 7, 10-V α 12, 11-V α 23 und 12-V α 25). Als Kontrolle wurde die TZR-Hybridomzelllinie JM22 mitgeführt (Siewert et al., 2012), die den TZR $V\alpha$ 10 $V\beta$ 17 exprimiert und die das Peptid der Aminosäuren 58 - 66 des Influenza Matrixproteins (flu58-66) HLA-A*0201 (HLA-A2) restringiert erkennt (Gotch et al., 1987; Moss et al., 1991).

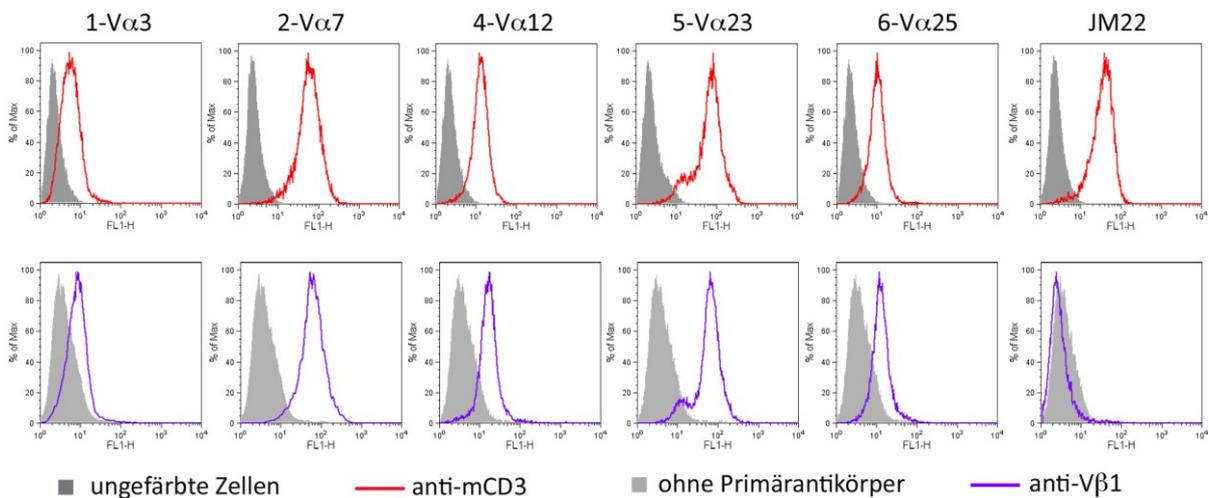


Abbildung 10: Durchflusszytometrischer Nachweis der $\alpha\beta$ -Expression der TZR-Transfektanten

Der Erfolg der stabilen $\alpha\beta$ -Ketten-Koexpression wurde durch den Nachweis der TZR-Oberflächenexpression mit Hilfe eines direkt-markierten Antikörpers (FITC) gegen das murine CD3 ϵ -Molekül (rote Linie) sowie mit einem unmarkierten Antikörper gegen die humane V β 1-Kette (lila Linie) in der Durchflusszytometrie erbracht. Der gebundene Primärantikörper gegen V β 1 wurde mit einem Alexa 488-gekoppelten anti-Ratten-Antikörper detektiert. Die Kontrolle erfolgte in Parallelansätzen beim mCD3 ϵ -Nachweis mit ungefärbten Zellen und beim Nachweis der V β 1-Kette ohne Primärantikörper (graues Histogramm). Dargestellt ist jeweils nur ein positiver Klon der TZR-Transfektanten von fünf α -Kandidaten^{ReA}-Ketten mit der klontypischen V β 1^{ReA}-Kette (Bezeichnung darüber 1-V α 3 bis 6-V α 25), wobei die TZR-Expression der gleichen α -Ketten mit der alloreaktiven V β 1^{HLA-B27}-Kette identisch ist. Das 58-TZR-Hybridom JM22 exprimiert den TZR V α 10V β 17 und ist als Positivkontrolle für die mCD3-Färbung und als Negativkontrolle für die V β 1-Färbung mit gezeigt. In den Diagrammen zeigt die Abszisse jeweils die Fluoreszenzintensität, die Ordinate den Anteil der maximalen Zellzahl in Prozent.

Das Ergebnis zeigt, dass fünf der sechs verschiedenen rekombinant exprimierten α -Kandidaten-Ketten mit beiden V β 1-Ketten in einer Oberflächenexpression korrekt gepaarter $\alpha\beta$ -TZR resultierten. Bei den Transfektionen mit der α -Kette VA8JA7 in RSV5hygro konnte für beide V β 1-Ketten bei je zwölf untersuchten Klonen keine mCD3-Expression nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die expandierte und isolierte VA8JA7-Kette aus SF-T-Zellen paart also weder mit der alloreaktiven noch der klontypischen TZR β -Kette. Diese Transfektanten wurden nicht weiter verwendet.

6.3.1.3 Transduktion der TZR-Transfektanten mit Retrovirus für hCD8-cDNS

Als wichtiges Korezeptormolekül des TZR-Komplexes in zytotoxischen T-Zellen agiert CD8. Die TZR-Transfektanten wurden mit dem rekombinanten Virus für humanes CD8 $\alpha\beta$ transduziert, damit optimale Bedingungen für die TZR-Hybridome zur Erkennung eines arthritogenen Peptids im Kontext von HLA-B27 geschaffen wurden. Die Transduktion erfolgte mit der murinen ecotropen Verpackungszelllinie GP+E-hCD8, die ein CD8 $\alpha\beta$ -Retrovirus erzeugt (durch Transfektion von pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β in GP+E 86). Der Expressionsvektor wird mittels der Retroviren auf die Zielzellen übertragen und die cDNS der CD8-Ketten können ins Genom der TZR-Hybridome integrieren. Nach einer zweitägigen Kokultur der Verpackungszelllinie mit den TZR-Hybridomen wurden die Transfektanten auf den Expres-

sionsvektor pLPC-hCD8 α -IRES2-hCD8 β mit Puromycin selektioniert (siehe Abschnitt 5.3.5 (S. 54). Der Erfolg der Transduktion wurde durch die hCD8-Oberflächenexpression im Durchflusszytometer mit einer Anfärbung der hCD8 β -Kette nachgewiesen. Abbildung 11 veranschaulicht die Ergebnisse der FACS-Analyse der hCD8-Expression.

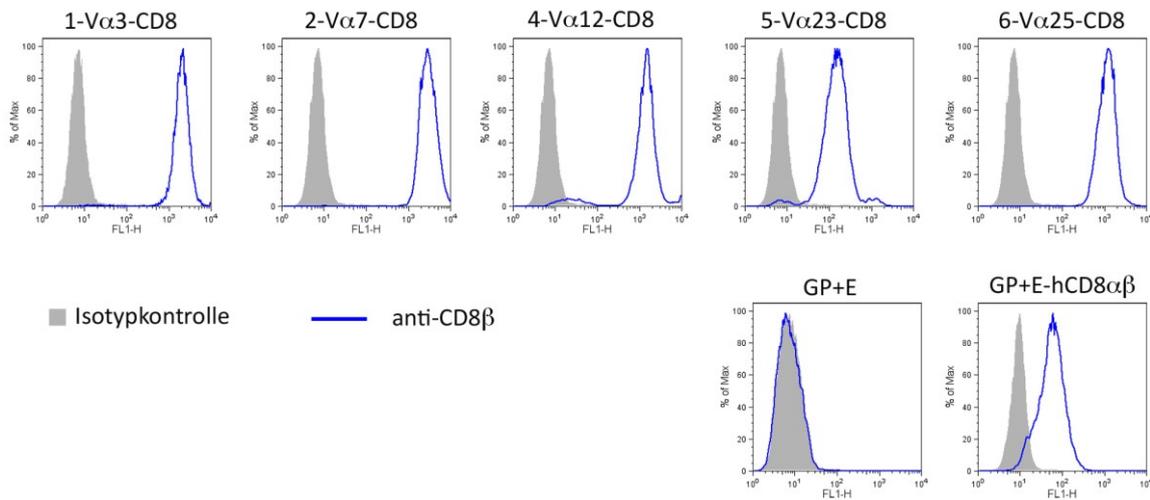


Abbildung 11: Untersuchung der TZR-Transfektanten auf hCD8 Oberflächenexpression

Nach retroviraler Transduktion eines Expressionsvektors für die cDNS der humanen CD8 $\alpha\beta$ -Moleküle wurden die TZR $\alpha\beta^{\text{ReA}}$ -Transfektanten auf die CD8-Oberflächenexpression mit Hilfe des Antikörpers gegen die hCD8 β (blaue Linie) in einer FACS-Analyse untersucht. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit dem Alexa 488-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Die Isotypkontrolle wurde in einem Parallelansatz mit einem IgG2a Maus Kontrollantikörper und dem Alexa 488-gekoppelten anti-Maus-Antikörper durchgeführt (graues Histogramm). Als Negativkontrolle diente die Zelllinie GP+E 86, die kein Retrovirus produziert, und als Positivkontrolle die zur Transduktion verwendete Retrovirus produzierende Zelllinie GP+E-hCD8 $\alpha\beta$. In den Diagrammen zeigt die Abszisse jeweils die Fluoreszenzintensität, die Ordinate den Anteil der maximalen Zellzahl in Prozent.

Der Antikörper erkennt die humane CD8 β -Kette, die nur als Heterodimer mit hCD8 α auf der Oberfläche exprimiert wird im Gegensatz zum hCD8 α -Molekül, das auch als Homodimer erscheint. Das Ergebnis zeigt bei allen TZR-Transfektanten mit der klontypischen β^{ReA} -Kette eine positive CD8-Oberflächenexpression, was den Erfolg der Transduktion bestätigt. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Klone je TZR-Transfektante. Bei den fünf TZR-Transfektanten mit der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette (7-V α 3 bis 12-V α 25) konnte keine vollständige CD8-Expression auf den TZR-Hybridomen nach jeweils drei unabhängigen Transduktionsansätzen (verwendet wurden zwei verschiedene Klone je TZR-Transfektante) nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die FACS-Analyse zeigte Doppelpopulationen mit einer positiven CD8-Expression von bis zu 42 % der Population. Die Klone der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette mit der stärksten CD8-Expression wurden daraufhin für die Untersuchung einer möglichen HLA-B27-Alloreaktivität verwendet (siehe Abschnitt 6.3.3, S. 86).

Alle weiteren Versuche zur Suche nach einem potentiellen Antigen (Abschnitt 6.3.4, S. 87f und Abschnitt 6.4, S. 90ff) erfolgten mit den TZR-Transfektanten der klontypischen β^{ReA} -Kette, bei denen die Transduktion, wie hier gezeigt, zu einer vollständigen hCD8-Expression führte. Die Bezeichnung der 58-TZR $\alpha\beta$ -CD8-Transfektanten entspricht im Folgenden 1-V α 3-CD8, 2-V α 7-CD8, 4-V α 12-CD8, 5-V α 23-CD8 und 6-V α 25-CD8.

6.3.2 Nachweis der Funktionalität der rekombinanten T-Zell-Hybridome durch TZR-Aktivierung

Die Aktivierung des spezifischen TZR naiver T-Zellen und ihre Reifung zu T-Effektorzellen resultiert in der Sekretion des Zytokins Interleukin-2 (IL-2), das die T-Zellen autokrin und parakrin zur Proliferation und Differenzierung anregt. Die etablierten TZR-Transfektanten wurden auf ihre Aktivierbarkeit und Funktionalität anhand ihrer Fähigkeit zur IL-2-Produktion untersucht. Die starke Bindung monoklonaler Antikörper gegen das murine CD3 ϵ -Molekül oder gegen die V β 1-Kette des TZR führt zur Kreuzvernetzung des TZR-CD3-Komplexes, was schließlich zu einer Aktivierung der TZR-Hybridome und somit zu einer IL-2 Sekretion führt. Alle zehn stabilen TZR-Transfektanten wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch die Stimulation mit monoklonalen Antikörper untersucht und die resultierende Zytokinproduktion in den Zellüberständen anhand eines ELISAs spezifisch für das IL-2 der Maus gemessen. Die Stimulation der TZR-Transfektanten durch monoklonale Antikörper gilt auch als unphysiologische Aktivierung und die genaue Durchführung ist in Abschnitt 5.4.2.1 (S. 55) und der Nachweis von produziertem Maus-IL-2 mittels ELISA ist in Abschnitt 5.4.2.3 (S. 57) aufgeführt.

Das Ergebnis der gemessenen IL-2 Konzentrationen gibt das Diagramm in Abbildung 12 wieder. Gezeigt sind die erfolgreichen Aktivierungen jeweils bei ein von zwei unabhängigen Zellklonen der TZR-Transfektanten mit der klonotypischen β^{ReA} -Kette in Verbindung mit jeweils fünf verschiedenen α -Kandidaten-Ketten.

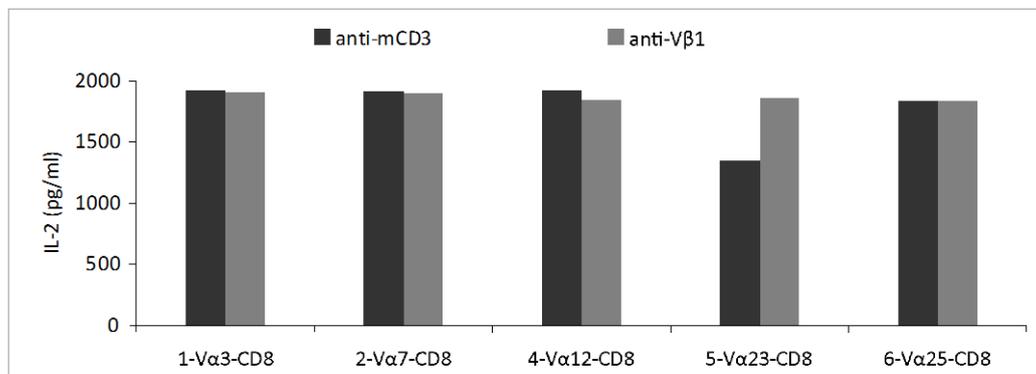


Abbildung 12: IL-2 Produktion nach Aktivierung der TZR-Transfektanten mit monoklonalen Antikörpern mCD3 und V β 1

Nach Stimulation von 5×10^4 Zellen TZR-Transfektanten mit Antikörper gegen mCD3 ϵ (schwarz) oder V β 1 (grau) wurde die IL-2-Konzentration nach 18 Std. im Zellüberstand (je 100 μ l in einem Loch einer 96-Loch-Platte) mit Hilfe eines Maus-IL-2 ELISAs bestimmt und die Aktivierbarkeit und Funktionalität der TZR β^{ReA} -Transfektanten erfolgreich nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente in einem unabhängigen Ansatz der Zellüberstand unstimulierter Transfektanten (negativer Wert im Diagramm nicht gezeigt). Die Höhe der Balken gibt die IL-2 Konzentrationen in pg/ml wieder, wobei die Werte durch OD-Werte der mitgeführten Standardkurve definierter IL-2-Konzentrationen ermittelt wurden und jeweils Mittelwerte zweier Parallelansätze mit Abzug des Leerwerts (Mediumkontrolle) sind. Die Bezeichnungen der TZR β^{ReA} -Transfektanten mit fünf verschiedenen α -Ketten sind auf der x-Achse angegeben, wobei jeweils die Werte eines von zwei getesteten Klonen je TZR-Transfektante repräsentativ dargestellt sind.

Das Ergebnis ist repräsentativ für viele unabhängige Ansätze, da die Antikörper-induzierte Aktivierung der TZR-Transfektanten als Positivkontrolle in den weiteren Versuchen herangezogen wurde. Es entspricht ebenfalls der identisch gemessenen IL-2-Produktion für die Aktivierung aller fünf verschiedenen TZR-Transfektanten der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette (nicht gezeigt).

Es kann gefolgert werden, dass alle zehn Transfektanten mit einer positiven TZR $\alpha\beta$ -Oberflächenexpression aktivierbar waren und die Fähigkeit aufwiesen IL-2 zu produzieren. Die funktionellen rekombinanten TZR-Transfektanten konnten im Weiteren als Werkzeug zur Suche nach einem potentiell arthritogenen Peptid verwendet werden.

6.3.3 Untersuchung der allogenen TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Transfektanten auf HLA-B27-Alloreaktivität

Zunächst sollte eruiert werden, ob die in der Literatur als alloreaktiv beschriebene rekombinante $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette zur Ausformung eines TZR im Kontext mit verschiedenen α^{ReA} -Kandidaten-Ketten fähig ist. Weiterhin sollte geklärt werden, ob diese TZR durch HLA-B27 ohne Zugabe externer Peptide stimuliert werden können und eine mögliche Alloreaktion aufzeigen. Eine alloreaktive Aktivierung von TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten, die in dieser Arbeit isoliert wurden, ist bisher nicht bekannt. Die assoziierte HLA-B27 alloreaktive α -Kette in der Literatur ist die hier nicht rekombinant angewendete Umlagerung VA16JA4 (Barber et al., 1996, Zugriffsnummer U39096). Ein Aktivierungssignal wäre ein Hinweis auf eine Alloreaktion gegen HLA-B27, womöglich mit einem maßgeblichen Beitrag der $V\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette an der Erkennung von HLA-B27.

Die Reaktivität der TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette wurde mit Hilfe von HLA-B27 Transfektanten (L-B27) untersucht, die im Rahmen der Diplomarbeit von Petra Prinz etabliert wurden (Prinz, 2006). Die Transfektanten der Mausfibroblastenzelllinie L929 exprimierten stabil HLA-B*2705 in Verbindung mit humanem β_2 -Mikroglobulin (hier nicht gezeigt). Außerdem diente zusätzlich in einem unabhängigen Ansatz die HLA-B27⁺ humane B-Zelllinie BTB als Präsentant des HLA-B27-Moleküls. Als Negativkontrolle wurde die stabile L929-Transfektante L-B7 verwendet, die HLA-B7 mit humanem β_2 -Mikroglobulin exprimiert. Die Stimulation wurde anhand der fünf TZR-Hybridome 7-V α 3-CD8, 8-V α 7-CD8, 10-V α 12-CD8, 11-V α 23-CD8, 12-V α 25-CD8, die mit der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette transfiziert wurden (siehe Abschnitt 6.3.1.1, S. 81) und die eine bis zu 42 % positive Expression des transduzierten Korezeptor CD8 aufwiesen (siehe Abschnitt 6.3.1.3, S. 83), untersucht. Die Durchführung erfolgte wie im Methodenteil in Abschnitt 5.4.2.2 (S. 56) beschrieben. Den konfluenten L-B27/L-B7-Zellen wurde jedoch kein Peptid zugegeben, da hier das Interesse auf einer möglichen HLA-B27-Alloreaktivität lag.

Bei keiner TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Transfektante konnte eine Aktivierung durch HLA-B27 festgestellt werden, was im Diagramm in Abbildung 13 verdeutlicht wird. Nur bei den Positivkontrollen konnte eine IL-2-Produktion nach Stimulation mit dem Antikörper gegen mCD3 bei jeweils zwei unabhängigen Zellklonen pro Transfektion, von denen jeweils ein Klon dargestellt ist, bestimmt werden.

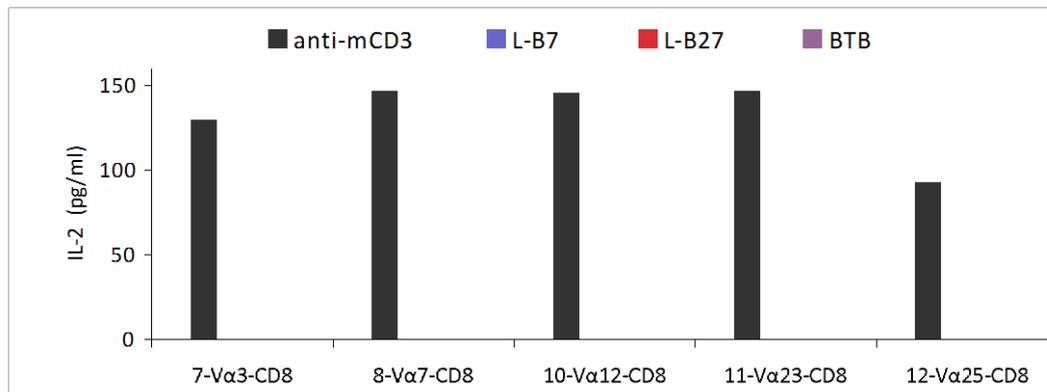


Abbildung 13: Analyse der TZRβ^{HLA-B27}-Transfektanten auf HLA-B27-Alloreaktivität

Keine Alloreaktivität gegen HLA-B27 konnte anhand der produzierten Maus-IL-2-Menge im Zellüberstand (je 100 µl im Loch einer 96-Loch-Platte) stimulierter TZRβ^{HLA-B27}-Transfektanten mit Hilfe eines Maus-IL-2 ELISAs nachgewiesen werden. Die Stimulation von 5×10^4 Zellen erfolgte 16 - 18 Std. mit dem Antikörper gegen mCD3 ϵ als Positivkontrolle (schwarz), mit konfluenten L-B7 als Negativkontrolle und mit konfluenten L-B27 und 5×10^4 HLA-B27⁺ BTB (die Farbsymbollegende oberhalb der Balken zeigt die unterschiedlichen Stimulationsparameter an).

Die Höhe der Balken gibt die IL-2 Konzentrationen in pg/ml wieder, wobei die Werte durch OD-Werte der mitgeführten Standardkurve definierter IL-2-Konzentrationen ermittelt wurden und jeweils Mittelwerte zweier Parallelansätze mit Abzug des Leerwerts (Mediumkontrolle) sind. Die Bezeichnungen der TZRβ^{HLA-B27} Transfektanten mit fünf verschiedenen α -Ketten sind auf der x-Achse angegeben, wobei die Werte eines von zwei unabhängigen Klonen je TZR-Transfektante gezeigt sind.

6.3.4 Untersuchung der klontypischen TZRβ^{ReA}-Transfektanten auf Aktivierung durch ein HLA-B27 restringiertes Selbstantigen

Die TZRβ^{ReA}-Transfektanten sollten zur Aufklärung beitragen, in welcher Assoziation der pathogene TZR durch eine der α -Kandidaten-Ketten ausgebildet wird und welches potentiell arthritogene Peptid dieser TZR erkennen würde. Bei der Suche nach einem vermeintlich arthritogenen Peptid war von Interesse, ein HLA-B27 restringiertes Selbstpeptid aus dem Protein Aggrecan, zu untersuchen, von dem bekannt war dass es effektiv ZTL stimuliert und eine T-Zell-Antwort induziert (Kuon et al., 2004). Dieses Epitop Nr. 67 (SRHHAFCFR) umfasst die Aminosäuren 667 bis 675 des humanen Proteins Aggrecan, welches ein Proteoglykan ist und als Bestandteil des hyalinen Knorpels an den Sehnenansätzen zu finden ist.

Um eine Reaktivität der TZRβ^{ReA}-Transfektanten zu untersuchen, wurden die L-B27 Zellen mit dem Peptid Nr. 67 von Aggrecan beladen und mit den TZR-Transfektanten zur Stimulation kokultiviert (siehe Methode im Abschnitt 5.4.2.2, S. 56). Die Messung der IL-2-Sekretion im Maus-IL-2-ELISA wurde wiederum als Nachweis für eine mögliche TZR-Aktivierung durch das HLA-B27 präsentierte Epitop von Aggrecan herangezogen. Als Positivkontrolle des angewandten Versuchsansatzes wurde die TZR-Hybridomzelllinie JM22 verwendet. JM22 wird durch das Peptid flu (58 - 66; GILGVFVTL) vom Influenzamatric-Protein restringiert von HLA-A*0201 aktiviert. HLA-A*0201 wird von der LTK-A2-Transfektante (L-A2) exprimiert.

In Abbildung 14 wird das Ergebnis der IL-2 Sekretion der verschiedenen TZR-Transfektanten 1-V α 3-CD8, 2-V α 7-CD8, 3-V α 12-CD8, 4-V α 23-CD8 und 5-V α 25-CD8 in einem Balkendiagramm dargestellt.

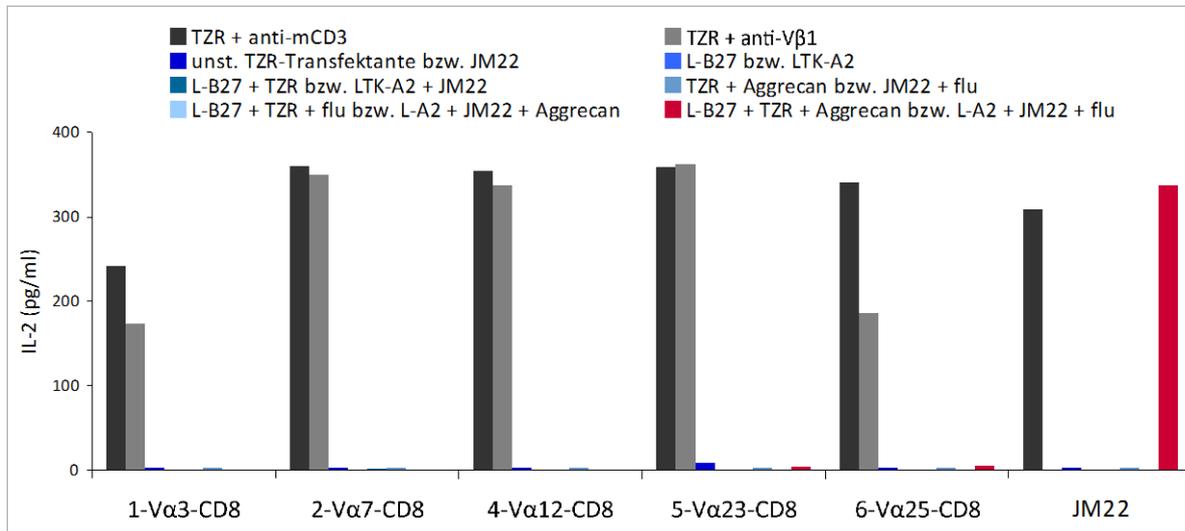


Abbildung 14: Analyse der Aktivierung der TZR β^{ReA} -Transfektanten durch HLA-B27 präsentierte Aggrecanpeptid

Keine Aktivierung der TZR β^{ReA} -Transfektanten durch HLA-B27 präsentierte Selbstpeptid Aggrecan (100 μM ; rot) konnte im Vergleich zur Stimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen mCD3 oder V β 1 (schwarz/grau) festgestellt werden. Die Stimulation von 5×10^4 TZR-Zellen erfolgte 16 - 18 Std. mit Aggrecan (oder flu) beladenen L-B27 (oder L-A2) und unterschiedlichen unabhängigen Negativkontrollansätzen und die produzierte mIL-2-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle diente die über flu (5 μM) präsentierte HLA-A*0201 (L-A2) induzierte IL-2-Sekretion von JM22 (rot). Die Farbsymbollegende oberhalb der Balken zeigt die unterschiedlichen Stimulationsparameter an. Die Höhe der Balken gibt die IL-2 Konzentrationen in pg/ml wieder, wobei die Werte durch OD-Werte der mitgeführten Standardkurve definierter IL-2-Konzentrationen ermittelt wurden und jeweils Mittelwerte dreier (bei L-B27/TZR/Aggrecan bzw. L-A2/JM22/flu) oder zweier Parallelansätze mit Abzug des Leerwerts (Mediumkontrolle) sind. Die Bezeichnungen der TZR β^{ReA} -Transfektanten mit fünf verschiedenen α -Ketten und JM22 sind auf der x-Achse angegeben, wobei jeweils Werte eines von zwei unabhängigen Klonen repräsentativ von jeder TZR-Transfektante gezeigt sind.

Keiner der fünf untersuchten TZR β^{ReA} -Transfektanten wurde zu einer Aktivierung durch das Selbstpeptid Aggrecan angeregt, da eine IL-2-Sekretion nicht nachgewiesen werden konnte (gezeigt ist jeweils ein von zwei Zellklonen der gleichen Transfektante, die jeweils ein vergleichbares Ergebnis brachten). Im Vergleich dazu, zeigten die Positivkontrollen wie erwartet nach der Stimulation der TZR-Transfektanten durch Antikörper sowie die Aktivierung von JM22 durch flu-HLA-A2 eine eindeutige IL-2-Sekretion. Eine Stimulation durch die verschiedenen Parameter, die als Negativkontrolle gewählt wurden, konnte nicht detektiert werden.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass erfolgreich stabile TZR-Transfektanten von der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ und der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette mit je fünf der sechs verschiedenen α -Kandidaten β^{ReA} -Ketten in Verbindung mit dem humanen CD8-Korezeptor generiert werden konnten, deren rekombinante TZR $\alpha\beta$ eine intakte Funktionalität und

Aktivierbarkeit aufzeigten. Eine mögliche Alloreaktion gegen HLA-B27 der $\text{TZR}\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Transfektanten unabhängig der in vivo korrespondierenden α -Kette konnte nicht nachgewiesen werden. Die klontypischen $\text{TZR}\beta^{\text{ReA}}$ -Transfektanten konnten ein HLA-B27 präsentierte autologes gelenkspezifisches Peptid von Aggrecan, das als Stimulus von ZTL beschrieben wurde, nicht erkennen und wurden nicht aktiviert. Diese Ergebnisse lieferten noch keine Hinweise auf eine definitive Einschränkung, welche $\text{TZR}\alpha$ -Kandidaten-Kette mit der $\text{TZR}\beta^{\text{ReA}}$ -Kette assoziiert ist. Die funktionellen TZR^{ReA} -Komplexe konnten jedoch in weiteren Versuchen herangezogen werden als fünf potentiell pathogene TZR^{ReA} -Kandidaten, mit deren Hilfe in einer Plasmid-kodierten Antigenbibliothek die Suche nach einem arthritogenen Peptid erfolgen kann.

6.4 Suche nach dem arthritogenem Antigen mit TZR^{ReA}-Kandidaten

Die generierten im vorigen Abschnitt 6.3 beschriebenen rekombinanten TZR^{ReA}-Kandidaten des T-Zell-Hybridoms sollten nun herangezogen werden, ein potentiell arthritogenes Antigen zu identifizieren. Die Auswahl, welche spezifischen Antigene als arthritogen infrage kommen und zu testen sind, kann in viele Richtungen erfolgen und die Suche nach einem Immunantwort induzierenden Antigen ist wie die sprichwörtliche Suche nach der Nadel im Heuhaufen, wie in der Einleitung bereits angeführt (siehe 2.4.3., S.16f). Es könnten jegliche bakterielle oder autologe Peptide mit unterschiedlichen Aminosäurelängen, die von HLA-B27 präsentiert werden, zur Analyse verwendet werden. Deshalb kam eine Methode zum Einsatz, die sich mit Hilfe von kombinatorischen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken unvoreingenommen an eine Suche nach einem potentiellen Antigen annähert. Dieses Verfahren wurde in der Gruppe um K. Dornmair etabliert, entspricht der Veröffentlichung von Siewert et al. 2012 und ist in der vorliegenden Arbeit für die TZR^{ReA}-Kandidaten angewendet worden. Einen schematischen Überblick der eingesetzten Methode zeigt die Abbildung 15.

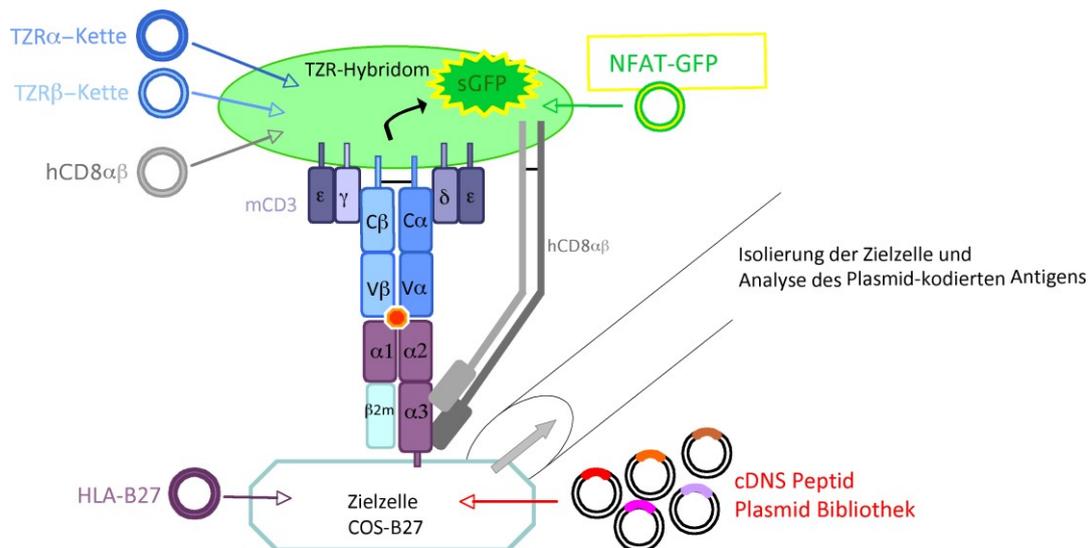


Abbildung 15: Schematische Übersicht der Antigensuche durch Aktivierung der rekombinanten TZR-Hybridome mittels HLA-B27 präsentierten cDNS-Peptid-Bibliotheken

Durch die transiente Transfektion von Plasmid-kodierten cDNS-Peptidbibliotheken in die HLA-B27 exprimierende stabile COS-7 Transfektante (COS-B27, türkis) fungieren diese als Zielzellen, da sie als Präsentanten vieler unterschiedlicher Antigene anhand der Expression von pHLA-B27-Molekülen (lila mit rotem Peptid) zur Verfügung stehen für eine Suche nach einem potentiell arthritogenen Peptid mit Hilfe der TZR-Kandidaten^{ReA}-Transfektanten. Die TZR-Hybridomzellen (grün) exprimieren einen funktionellen TZR-Komplex durch das Einbringen von vier Expressionsplasmiden, die für die rekombinanten TZRαβ-Ketten (blau) mit dem hCD8-Korezeptor (grau) und dem Reporter gen sGFP für eine NFAT-Aktivierung (grün-gelb) kodieren. Erkennen die TZR-Hybridomzellen nach Kokultivierung mit den Antigenpräsentierenden COS-B27 Zellen ein spezifisches Antigen, exprimieren sie nach TZR-Aktivierung (schwarzer Pfeil) sGFP (grüner Stern) und markieren dadurch die positive Zielzelle im Vergleich zu vielen negativen antigenpräsentierenden Zellen durch grünes Leuchten sichtbar im Fluoreszenzmikroskop. Die darunter liegende Zielzelle COS-B27 kann mit einer Mikrokapillare isoliert und das antigenkodierende Plasmid durch PCR wieder gewonnen und die Sequenz des potentiell positiven Antigens bestimmt werden (grauer Pfeil im rechten Teil des Bildes). (Methode nach Siewert et al., 2012).

Es werden in Zielzellen Plasmid-kodierte cDNS-Peptidbibliotheken transfiziert, die Peptide kodieren und diese, wenn passend, werden auf HLA-B27 den TZR^{ReA}-Hybridomen präsentiert. Die Erkennung eines spezifischen Antigens aus der Peptidbibliothek erfolgt mit einer Kokultur von TZR-Hybridomen, die mit einem Reporter gen für das grün fluoreszierende Protein sGFP (*super Green Fluorescent Protein*) ausgestattet wurden, das durch einen NFAT abhängigen Promotor (NFAT-sGFP) reguliert wird. Bindet der TZR an ein passendes pHLA-B27-Molekül, resultiert seine Aktivierung in einer NFAT kontrollierten Expression von sGFP und die T-Zelle leuchtet grün. Im Fluoreszenzmikroskop ist es daher möglich im Vergleich zur Durchflusszytometrie auch einzelne aktivierte T-Zellen zu erfassen und es findet zugleich eine Kennzeichnung des positiven Peptids statt, das die Aktivierung induziert hat und das umgeben ist von vielen negativen antigenpräsentierenden Zellen mit darüber liegenden nicht aktivierten T-Zellen. Die entsprechende unter der T-Zelle liegende positive pHLA-B27-Zielzelle kann daraufhin mit einer Mikrokapillare eines Mikromanipulators isoliert und die cDNS des Plasmid-kodierten Antigens durch PCR der Einzelzelle analysiert werden. Die Versuchsreihe der Antigen suche wurde in Mitwirkung mit Charlotte Flynn im Rahmen der Betreuung ihrer Masterarbeit durchgeführt. Damit dieses System zum Einsatz kommen kann, war es zunächst nötig, stabile HLA-B27 Transfektanten von COS-7 zu generieren, die HLA-B27 exprimieren und als antigenpräsentierende Zellen für die Präsentation vieler unterschiedlicher Peptide kodiert von Plasmiden der Peptidbibliotheken zur Verfügung stehen (siehe Abschnitt 6.4.2, S.93). Außerdem wurde als Indikator für eine TZR-Aktivierung das Reporter gen sGFP unter der Kontrolle einer NFAT-Aktivierung durch den Vektor pcDNA-NFAT-sGFP zusätzlich stabil in die TZR^{ReA}-Transfektanten eingebracht (siehe Abschnitt 6.4.1, S. 91). In den weiteren Abschnitten 6.4.3, 6.4.4 und 6.4.5 wird die Antigen suche mit Hilfe der fünf TZR^{ReA}-Kandidaten in verschiedenen Peptidbibliotheken beschrieben und die anschließende Analyse der isolierten positiven Plasmide mit deren kodierten Peptiden.

6.4.1 Generierung von 58-TZR $\alpha\beta$ ^{ReA}-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten

Die 58-TZR $\alpha\beta$ -CD8-Transfektanten mit der klontypischen β ^{ReA}-Kette (1-V α 3-CD8, 2-V α 7-CD8, 4-V α 12-CD8, 5-V α 23-CD8 und 6-V α 25-CD8) exprimieren einen funktionellen TZR-Komplex in Verbindung mit hCD8, wie im vorigen Abschnitt 6.3 dargestellt wurde. Damit sie für die Antigen suche durch das Ablesesystem mit dem Reporter gen GFP zur Verfügung standen, wurde der Vektor pcDNA-NFAT-sGFP stabil transfiziert. Die Transfektion mit Elektroporation erfolgte dabei auf die gleiche Weise wie die TZR-Transfektion der Expressionsvektoren für die α -Kette in RSV5hygro und β -Kette in RSV5neo (siehe Abschnitt 6.3.1.1, S. 81f und Methode im Abschnitt 5.3.3, S. 52f). Der Vektor pcDNA-NFAT-sGFP wurde zuvor mit dem Restriktionsenzym *Aaf* II linearisiert und die vollständige Restriktion auf einem Agarosegel nachgewiesen. Nach einer Selektion mit Vierfachselektionsmedium mit Antibiotika gegen die vier eingebrachten Expressionsvektoren, wobei Blastocidin für den neu eingebrachten pcDNA-NFAT-sGFP Vektor verwendet wurde, konnten für jeden der fünf verschiedenen Ansätze resistente Einzelklone isoliert und expandiert werden.

Der Erfolg der Transfektion in die TZR-Hybridomzellen wurde mit der Analyse der sGFP-Expression in Abhängigkeit des NFAT-Promotors durch die Stimulation der TZR-Komplexe mit monoklonalen Antikörpern gegen V β 1 überprüft. Die TZR-Aktivierung resultiert in einer

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und eine daraus folgende IL-2-Sekretion. Diese Zytokinproduktion der funktionellen 58-TZR $\alpha\beta^{ReA}$ -CD8-Transfektanten wurde bereits nachgewiesen (siehe Abschnitt 6.3.2, S. 85ff). Bei den hier generierten 58-TZR $\alpha\beta^{ReA}$ -CD8-NFAT-sGFP Zellen kann die Detektion der intrazellulären grünen Fluoreszenz des Reportergens sGFP für die erfolgreiche TZR-Aktivierung im Durchflusszytometer und im Fluoreszenzmikroskop herangezogen werden. Die Abbildung 16 zeigt die Analyse der NFAT-induzierten sGFP-Expression.

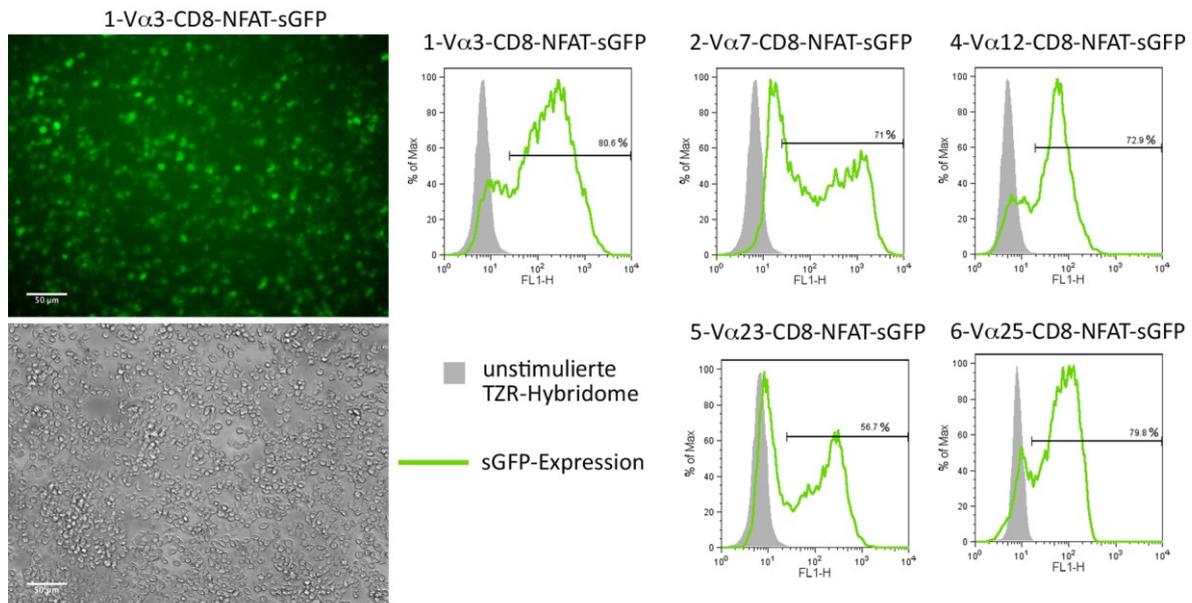


Abbildung 16: Untersuchung der sGFP-Expression nach Aktivierung der TZR^{ReA}-Transfektanten mit monoklonalem Antikörper V β 1

Nach Stimulation der fünf TZR^{ReA}-Transfektanten (Bezeichnungen über den Diagrammen z.B. 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP) mit monoklonalen Antikörper gegen V β 1, führt die Kreuzvernetzung der TZR-Komplexe zur Aktivierung der TZR-Hybridome durch intrazelluläre Signalweiterleitung, was eine NFAT-induzierte sGFP-Expression bewirkt. Der Nachweis der sGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop (linke Seite) und in der Durchflusszytometrie (rechte Seite) ist ein Reporter für die TZR-Aktivierung und bestätigt die erfolgreiche stabile Transfektion mit pcDNA-NFAT-sGFP. Dargestellt ist zum Vergleich ein Mikroskopiebild im Fluoreszenzkanal (oben) und im Durchlicht (unten) von Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP im Maßstab von 50 μ m.

Bei den Bildern der FACS-Analysen ist jeweils der prozentuale Anteil der sGFP-Expression von der 16 - 18 Std. mit V β 1-Antikörper stimulierten TZR^{ReA}-Transfektante (grüne Kurve) im Vergleich zur negativen Kontrolle der unstimulierten TZR-Hybridom-Transfektante (graues Histogramm) gemessen. In den Diagrammen zeigt die Abszisse jeweils die Fluoreszenzintensität, die Ordinate den Anteil der maximalen Zellzahl in Prozent.

Die verschiedenen Zellklone je TZR-Transfektante zeigten ein unterschiedliches Maß an sGFP-Expression, wobei die Zellklone, die die höchste GFP-Expression aufwiesen und somit am stärksten aktiviert werden konnten, weiter verwendet wurden. War das Aktivierungsmaß nach Antikörperstimulationen sehr gering (unter 55 %), wurde eine Einzelzellklonierung des T-Zell-Klons mit einer limitierenden Verdünnungsreihe in 96-Loch-Platten generiert, die Zellen expandiert und davon die Zellklone mit höchstem Aktivierungsmaß weiter verwendet. Im Durchflusszytometer konnten dabei ein Maß für die GFP-Expression der fünf stimulierten 58-TZR $\alpha\beta^{ReA}$ -CD8-NFAT-sGFP im Vergleich zu den unstimulierten TZR-Hybridomen in

Prozentzahlen von 56,7 % bis 80,6 % abgeleitet werden (vgl. Zahlen in den Diagrammen der Abbildung 16). Eine vollständige TZR-Aktivierung und Expression des Reportergens GFP von 100 % war nicht zu erwarten, da diese Beobachtung eines prozentualen Anteils der Aktivierung innerhalb einer T-Zell-Population auch in anderen NFAT-Promotor abhängigen Reportersystemen wie die lacZ-Expression bei der Analyse von T-Zell-Aktivierung gezeigt wurde (Karttunen und Shastri, 1994).

Das Ergebnis beweist, dass von allen fünf verschiedenen TZR-Hybridomen TZR $\alpha\beta^{\text{ReA}}$ -CD8-NFAT-sGFP generiert werden konnten und der Nachweis der sGFP Expression nach Antikörperstimulation wurde jeweils als Positivkontrolle in den weiteren Versuchen der Antigensuche eingesetzt.

6.4.2 Etablierung stabiler Transfektanten COS-B27

Als Zielzellen für die Präsentation von Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken mit HLA-B27 wurden stabile COS-B27 etabliert. In die Nierenfibroblastenzelllinie COS-7 der Grünen Meerkatze wurde der Expressionsvektor pTM-HLA-B27 für HLA-B*2705 mittels Lipofektion transfiziert. Der Vektor wurde dafür mit den Restriktionsenzymen *Sa*/I linearisiert und die vollständige Restriktion überprüft. Nach Selektion der Transfektanten auf das Resistenzgen Neomycin im pTM-Vektor, konnten resistente Zellklone isoliert und expandiert werden. Da das humane β 2M eine 93-%ige Homologie zum β 2M der grünen Meerkatze aufweist und zum korrekten Zusammenbau der HLA-Moleküle und Zelloberflächenexpression auf den COS-7 Zellen das autologe β 2M verwendet wird, wurde die auf eine Koexpression von h β 2M verzichtet. Der Erfolg der stabilen Zelloberflächenexpression von HLA-B27 wird durch Abbildung 17 veranschaulicht.

Als antigenpräsentierende Zielzellen standen stabile Transfektanten COS-B27 zur Verfügung, mit deren Hilfe es möglich war ein potentiell arthritogenes Peptid mittels einer Peptidbibliothek zu präsentieren und zu identifizieren, wenn es die TZR $^{\text{ReA}}$ -Transfektanten erkennen und davon aktiviert werden.

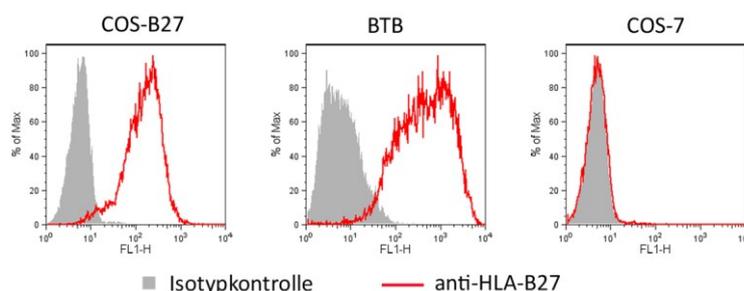


Abbildung 17: Nachweis der HLA-B27 Oberflächenexpression der COS-B27-Transfektanten

Der Erfolg der stabilen Transfektion von COS-B27 wurde durch die Detektion der Oberflächenexpression von HLA-B27 mit dem Antikörper TM1 (unverdünnter Antikörperhybridomüberstand; rote Linie) in der Durchflusszytometrie erbracht. Als Isotypkontrolle diente der Maus IgG2b Kontrollantikörper (1:100) in einem Parallelansatz (graues Histogramm). Der gebundene Primärantikörper wurde mit dem Alexa 488-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:50) detektiert. Als Positivkontrolle erfolgte eine HLA-B27-Färbung der HLA-B27 $^+$ humanen Zelllinie BTB und als Negativkontrolle wurden untransfizierte COS-7 Zellen verwendet. In den Diagrammen zeigt die Abszisse jeweils die Fluoreszenzintensität, die Ordinate den Anteil der maximalen Zellzahl in Prozent.

6.4.3 Antigensuche mit Hilfe von Plasmid-kodierten cDNS-Peptidbibliotheken

Die fünf verschiedenen TZR α -CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten wurden herangezogen ein passendes Peptid aus der Plasmid-kodierten Peptidbibliothek heraus zu suchen und durch ihre TZR-Aktivierung gegebenenfalls zu identifizieren. Die Erkennung künstlich generierter Mimotope könnte Hinweise auf ein potentiell arthritogenes Antigen liefern. Präsentiert wurden die verschiedenen Peptide auf HLA-B27 mittels einer transienten Transfektion der COS-B27 Transfektanten mit Peptidbibliotheken in den Expressionsvektoren pcDNAlib. Es standen vier verschiedene cDNS-Peptidbibliotheken zur Verfügung mit unterschiedlich kodierten Peptidlängen und zufällig angeordneten Aminosäuren (von K. Dornmair).

Da nicht bekannt war, welche Peptidlänge zur Aktivierung der TZR^{ReA}-Hybridome führt, wurden unvoreingenommen die vier verschiedenen Peptidbibliotheken untersucht. An jeder Position dieser Peptide kann jede Aminosäure zufällig auftreten. Die Expressionsvektoren waren pcDNAlib-N24, -N27, -N30 und -N39, die für Peptide kodieren mit einer Aminosäurelänge von acht (durch 24 Nukleotide, N24), neun (N27), zehn (N30) oder dreizehn (N39) Aminosäuren. Die kodierende Region der Peptidbibliotheken von 24 bis 39 Nukleotiden wird jeweils von einem Start- und Stoppkodon sowie von einer Kozak-Sequenz und den Restriktionsschnittstellen *Asc* I/*Not* I flankiert. Zur Veranschaulichung der kodierenden Region der Peptidbibliotheken ist die Sequenz der Insertion von pcDNAlib-N24 in Abbildung 18 **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.** dargestellt.

Peptidpositionen													
<i>Asc</i> I	<u>Kozak</u>	Start	1	2	3	4	5	6	7	8	Stop	<i>Not</i> I	
CAGGGAAGGCGCGCCACC		ATG	NNK	TGA	GCGGCCGCTAAACTAT								
		M	X	X	X	X	X	X	X	X	*		

Abbildung 18: Sequenz der kodierenden Insertion in pcDNAlib-N24 zur Expression einer Peptidbibliothek mit zufällig angeordneten Aminosäuren in den exprimierten Oktameren

Dargestellt ist die kodierende Region der Peptidbibliothek als Einzelstrangnukleotidsequenz, die nach *Asc* I/*Not* I Restriktion in den Vektor pcDNAspacer inseriert wird und mit 24 Nukleotiden (rot) ein Oktamer mit zufällig angeordneten Aminosäuren (darunter mit roten X angegeben) kodiert und den Expressionsvektor pcDNAlib-N24 erzeugt. Die Restriktionsschnittstellen in den flankierenden Sequenzen vor dem Startkodon und nach dem Stoppkodon sind kursiv angegeben, N steht für den zufälligen Einbau eines beliebigen Nukleotids (A, C, T, G) und K für den willkürlichen Einbau der Nukleotide G oder T zur Verringerung von Stoppkodonen.

Damit die Wahrscheinlichkeit verringert wird, verkürzte Peptide durch den zufälligen Einbau von Stoppkodonen zu erhalten, wurde die Sequenz des Oligonukleotids der Peptidbibliotheken so konstruiert, dass jeweils an der dritten Position jedes Basentriplets nur Guanin oder Thymidin eingebaut wird. Statt drei verfügbarer Stoppkodone, kann nur noch eines zufällig auftreten.

Die theoretische Wahrscheinlichkeit verschiedener Peptidvariationen innerhalb der Bibliothek von 20^x , wobei x der Anzahl vorhandener Aminosäuren entspricht, ist außerdem limitiert aufgrund der korrekten Ligation der Peptidfragmente in den Vektor und der Transformations-effizienz bei der Klonierung. Die tatsächlich generierte Anzahl an Klonen der hier

verwendeten Peptidbibliotheken sind im Abschnitt 4.1.2 (S. 24) angegeben und entspricht der maximalen möglichen Komplexität der Peptidbibliothek. Dazu wird die effektive Anzahl exprimierter Peptide durch Plasmide mit nicht korrekten Peptidinsertionen weiter verringert. Nichtsdestotrotz kann man davon ausgehen, dass je nach Bibliothek mehrere Millionen unterschiedlicher Peptide in den COS-7-Zellen nach Transfektion exprimiert und ein ausreichendes Repertoire auf HLA-I-Molekülen präsentiert wird.

Damit die effiziente Expression der Peptidvariationen sichergestellt wird, wurde die Transfektionseffizienz der Lipofektion mit FugeneHD untersucht. Die Antigenexpression der Plasmid-kodierten Peptidbibliothek wurde durch den Vektor pcDNA-sGFP, der statt eines Peptids sGFP exprimiert, simuliert. Es konnte im Durchflusszytometer eine intrazellulärer sGFP-Expression 48 Stunden nach Transfektion in die COS-B27-Zellen von 41 - 54 % nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei Siewert (2011) wurde der Nachweis erbracht, dass nach transienter Transfektion von peptidkodierenden Plasmiden oder von pcDNA-sGFP in COS-7-Zellen die höchste Proteinexpression nach 48 - 72 Stunden stattfand und die höchste Transfektionseffizienz mittels Lipofektion mit FugeneHD erzielt werden konnte.

Die genaue Durchführung der Aktivierung der TZR-Hybridome durch die Plasmid-kodierten Peptide nach transienter Transfektion der pcDNAlib in COS-B27 ist in Abschnitt 5.4.2.2 (S. 56) beschrieben. Die HLA-B27 exprimierenden COS-B27-Transfektanten wurden mit den peptidkodierenden Plasmiden transfiziert und nach insgesamt 48 Stunden, im Fluoreszenzmikroskop auf eine TZR-Aktivierung nach 16 Stunden Kokultivierung analysiert.

Wurde nach Stimulation der TZR^{ReA}-Transfektanten mit einer Plasmid-kodierten Peptidbibliothek eine Aktivierung anhand der GFP-Expression mit einer Ansammlung grün fluoreszierender TZR-Hybridomzellen aufgedeckt, wurde die darunter liegende COS-B27-Zelle mit Hilfe einer Glaskapillare in einem Mikromanipulator isoliert (siehe Abschnitt 5.4.3.1, S. 59). Ein Beispiel von einer Ansammlung von grün fluoreszierenden TZR-Hybridomen einschließlich der Isolierung der Antigen-tragenden COS-B27-Zelle wird in Abbildung 19 veranschaulicht. Das Plasmid-kodierte Antigen wurde anschließend umgehend in einer Einzelzell-PCR amplifiziert und zur weiteren Analyse subkloniert (siehe folgender Abschnitt 6.4.4).

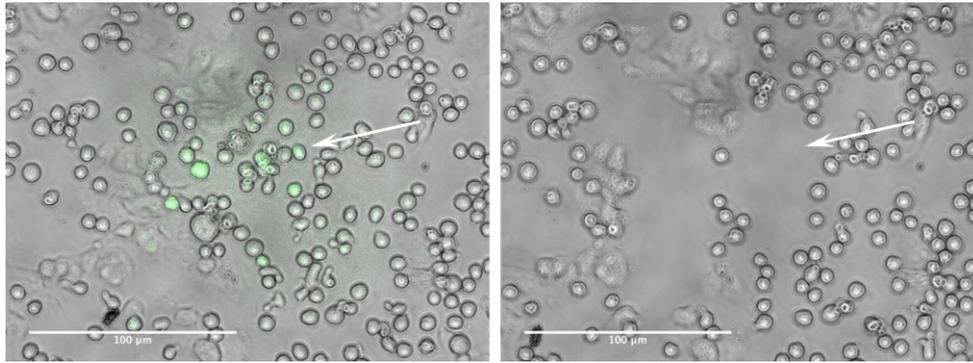


Abbildung 19: TZR^{ReA}-Aktivierung durch pHLA-B27 und Isolation der positiven Plasmid-kodierten antigenpräsentierenden COS-B27-Zelle

Die 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten wurden mit COS-B27, die mit Plasmid-kodierten Peptidbibliothek (pcDNAlib-N24) transfiziert worden waren, 16 Std. kokultiviert. Eine Anhäufung grün fluoreszierender TZR-Transfektanten nach TZR-Aktivierung wurde im Fluoreszenzmikroskop detektiert (linkes Bild, 7 grün leuchtende TZR-Hybridomzellen, 48 Std. nach Transfektion). Die darunter liegende COS-B27-Zelle (Nr. 8.3.2), die potentiell das erkannte Antigen exprimiert, wurde mit Hilfe einer Glas-kapillare eines Mikromanipulators (15 μ m Durchmesser) isoliert (rechtes Bild zeigt die entfernte Zelle) und das antigenkodierende Plasmid analysiert. Das linke Bild ist eine Überlagerung einer Aufnahme im Durchlicht und im Fluoreszenzkanal, rechts ist der identische Bildausschnitt im Durchlicht nach der Isolierung der COS-B27-Zelle (Pfeile) dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Insgesamt wurden 24 einzelne antigenpräsentierende COS-B27 isoliert, die zu einer TZR-Aktivierung der TZR $\alpha\beta$ -CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten geführt hatten. Es wurden nur Zellen entfernt, die zueinander in festem Kontakt standen und der TZR der Hybridomzellen vermeintlich eine Bindung mit dem pHLA-B27 eingegangen war. Darüber hinaus waren die Gruppen mit mehreren grün fluoreszierenden TZR-Hybridomzellen von besonderem Interesse, um eine falsch-positive TZR-Aktivierung bei einzeln liegenden Zellen auszuschließen. Zum Vergleich wurde bei jedem Ansatz eine Negativkontrolle mitgeführt, was einer Kokultivierung von TZR^{ReA}-Transfektanten mit untransfizierten COS-B27 entsprach.

Die verschiedenen Stimulationen der TZR^{ReA}-Transfektanten mit den unterschiedlichen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken ist in der Tabelle 4 aufgelistet. Um eine Aktivierung aufzudecken, die durch ein Peptid von einer der vier verwendeten cDNS-Peptidbibliotheken verursacht wurde, und möglichst eine Präsentation einer großen Anzahl verschiedener Peptide zu gewährleisten, erfolgte jeweils eine Inspektion von mindestens $2,4 \times 10^6$ COS-B27. D.h. im Fluoreszenzmikroskop wurde jede TZR^{ReA}-Transfektanten mit unterschiedlichen Plasmid-kodierten Peptiden transfizierten COS-B27 kokultiviert und auf TZR-Aktivierung untersucht, wobei jeweils mindestens 36 cm² adhärenzte COS-B27-Zellen mit optimalen Zellkontakt zu den T-Zell-Hybridomen abgesucht wurden. In der Tabelle 4 ist die Antigensuche der analysierten Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken mit den verschiedenen TZR^{ReA}-Transfektanten im Überblick dargestellt. Angeführt sind dabei die Anzahlen der inspizierten COS-B27-Zellen und die dabei isolierten antigenpräsentierenden Zellen pCOS-B27, wenn sie von aktivierten TZR-Transfektanten markiert wurden.

Tabelle 4: Antigensuche mit TZR^{ReA}-Transfektanten in verschiedenen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken

Die fünf verschiedenen TZR^{ReA}-Transfektanten wurden jeweils mit vier verschiedenen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken, die in COS-B27-Zellen transfiziert wurden, stimuliert. Angegeben ist jeweils die Zellzahl der inspizierten peptidpräsentierenden COS-B27-Zellen sowie die Zahl der davon isolierten pCOS-B27-Zellen, wenn sie durch eine Anhäufung darüber liegender aktivierter grün fluoreszierender TZR^{ReA}-Transfektanten markiert wurden und ein potentiell positives Antigen exprimieren könnten. Alle 24 isolierten pCOS-B27-Zellen wurden zur weiteren Analyse der peptid-kodierenden Plasmide herangezogen.

TZR^{ReA}- Transfektante	COS-B27 + pcDNAlib-N24 Oktamer	COS-B27 + pcDNAlib-N27 Nonamer	COS-B27 + pcDNAlib-N30 Dekamer	COS-B27 + pcDNAlib-N39 13-mer
1-Vα3-CD8- NFAT-sGFP	Inspektion von 6,2 x 10 ⁶ COS-B27; Isolation von 18 pCOS-B27	Inspektion von 3,6 x 10 ⁶ COS-B27 Isolation von 1 pCOS-B27	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine
2-Vα7-CD8- NFAT-sGFP	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 Isolation von 2 pCOS-B27	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 Isolation von 1 pCOS-B27	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine
4-Vα12-CD8- NFAT-sGFP	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine
5-Vα23-CD8- NFAT-sGFP	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 Isolation von 2 pCOS-B27	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine
6-Vα25-CD8- NFAT-sGFP	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine	Inspektion von 2,4 x 10 ⁶ COS-B27 keine

Es zeigte sich, dass nur drei der fünf verschiedenen TZR^{ReA}-Transfektanten durch Peptide von den vier unterschiedlichen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken aktiviert wurden. Bei den TZR^{ReA}-Transfektanten 4-V α 12-CD8-NFAT-sGFP und 6-V α 25-CD8-NFAT-sGFP konnte keine Gruppe grün fluoreszierender Zellen nach der Stimulation aufgedeckt werden. Die TZR^{ReA}-Kandidaten mit V α 12V β 1 und V α 25V β 1 wurden also nicht durch verschieden lange Peptide, die von HLA-B27 präsentiert wurden, aktiviert. Bei der Transfektante 2-V α 7-CD8-NFAT-sGFP wurden drei pCOS-B27-Zellen isoliert, wovon zwei ein Nonamer und eine ein Dekamer präsentierten. Die Inspektion der Transfektante 5-V α 23-CD8-NFAT-sGFP ergab die Isolierung von zwei pCOS-B27-Zellen, die mit der cDNS-Peptidbibliothek kodierend für Nonamere transfiziert waren, da diese anhand der TZR-Aktivierung zweier in Kontakt zur COS-B27-Zelle stehender grün fluoreszierender Hybridomzellen im Fluoreszenzmikroskop aufgedeckt wurden. Die Stimulierung der TZR-Transfektanten mit einer Plasmid-kodierten Peptidbibliothek für Peptide mit einer Länge von 13 Aminosäuren (pcDNAlib-N39) führte bei keiner TZR-Transfektante zu einer Aktivierung und es wurden dementsprechend keine pCOS-B27 Zellen isoliert.

Die Stimulierung der TZR-Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP mit COS-B27-Zellen, die mit der cDNS-Peptidbibliothek für Oktamere transfiziert wurden, offenbarte bereits bei der anfangs inspizierten Anzahl von $2,4 \times 10^6$ COS-B27 eine starke TZR-Aktivierung von acht Ansammlungen grün fluoreszierender Hybridomzellen. Dies führte zu der Annahme, dass der TZR mit V α 3V β 1 mit großer Wahrscheinlichkeit von einem Oktamer auf HLA-B27 aktiviert wird und dies Hinweise auf das potentiell arthritogene Antigen liefern könnte. Um davon eine größere Anzahl an peptidkodierenden Plasmiden analysieren zu können, sollten mehr pCOS-B27 isoliert werden und deshalb wurden weitere pcDNAlib-N24 transfizierte COS-B27 Zellen inspiziert ($6,2 \times 10^6$ pCOS-B27-Zellen in 90 cm^2). Schließlich wurden insgesamt 18 COS-B27 Zielzellen mit einer vermeintlichen Präsentation eines Oktamers entfernt, die von einer Anhäufung aktivierter 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten markiert wurden. Dabei variierte die Menge an aktivierten TZR-Hybridomzellen von 2 bis 15 grün fluoreszierender Zellen je Anhäufung. Davon unabhängig wurde zusätzlich eine COS-B27-Zelle, die mit der Plasmidbibliothek pcDNAlib-N27, die Nonamere kodiert, transfiziert wurde, isoliert. Diese pCOS-B27-Zelle stammt von einer TZR-Aktivierung zweier grün fluoreszierender Zellen der Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP bei der Inspektion von insgesamt $3,6 \times 10^6$ COS-B27-Zellen

Die peptidkodierenden Plasmide aller 24 isolierten COS-B27-Zellen wurden daraufhin auf ein potentiell positives Antigen mit weiteren Reaktivierungsschritten der TZR^{ReA}-Hybridome hin untersucht.

6.4.4 Identifizierung der Plasmid-kodierten Peptide isolierter COS-B27-Zellen durch Reaktivierung der TZR^{ReA}-Transfektanten

Nach der Isolierung der antigenpräsentierenden COS-B27 Zelle erfolgte die Analyse des Plasmid-kodierten Peptids (der Ablauf der einzelnen Schritte ist im Methodenteil Abschnitt 5.4.3 (S. 58) aufgeführt). Vorrangig sollte das positive Antigen, das zur Aktivierung der TZR-Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP geführt hat, herausgefiltert und verifiziert werden. Dazu wurden die Peptidinsertionen der Plasmide, die in der isolierten Einzelzelle enthalten sind, in einer Einzelzell-PCR mit den Primerpaar pcDNA2nd-for-TOPO/pcDNA3.1rev amplifiziert (siehe Abschnitt 5.1.5.5, S. 46). Das Entfernen der adhärennten COS-B27-Zelle führt zu einer heterogenen Population unterschiedlicher Plasmide. Denn durch die Glaskapillare können versehentlich mehrere COS-B27-Zellen eingesaugt werden. Außerdem kann eine COS-B27 Zelle auch unterschiedliche Plasmide aufgenommen haben. Darüber hinaus werden durch die Transfektionsmethode mittels FugeneHD bis zu 200 individuelle Plasmide in eine COS-7-Zelle transferiert und durch den sehr effizienten SV40-Replikationsursprung des Plasmids steigt die Kopienzahl der intrazellulären amplifizierten Plasmide auf mehr als 5000 pro einzelner COS-7-Zelle an (Siewert et al., 2012).

Um das positive Plasmid-kodierte Antigen herauszufiltern, wurde das Amplifikat subkloniert. Dazu wurde das PCR-Produkt gereinigt, auf einem Agarosegel nachgewiesen und mittels der eingefügten Nukleotidsequenz CACC am 5'-Ende (durch das entsprechende 5'-Oligonukleotid pcDNA2nd-for-TOPO) in den Vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO gerichtet

subkloniert. Dieser Vektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO kodiert die Peptide in allen weiteren Reaktivierungsschritten zur Analyse des positiven Antigens. Dabei erfolgte die Transformation des Vektors pcDNA3.1D/V5-His-TOPO in die hochkompetenten Bakterien ElectroMAX DH10B, um das isolierte Peptidrepertoire möglichst vollständig wieder zu gewinnen.

Mit Hilfe von Reaktivierungen der TZR-Transfektanten durch die Plasmid-DNS konnten die amplifizierte Plasmidinsertionen, die ursprünglich in der isolierten COS-B27-Zelle enthalten waren, zur Bestimmung des positiven Antigens untersucht werden. Der erste Reaktivierungsschritt sollte darüber aufklären, ob die gewonnene Plasmid-DNS nach Amplifikation und Subklonierung erneut zu einer TZR-Aktivierung führte und das positive Antigen isoliert werden konnte. Dazu wurden jeweils in zwei unabhängigen Doppelansätzen die subklonierte Plasmid-DNS der isolierten pCOS-B27-Zellen transient in COS-B27-Zellen transfiziert und die TZR-Aktivierung der entsprechenden TZR^{ReA}-Transfektanten im Fluoreszenzmikroskop nach 48 und 72 Stunden analysiert. Zeigte sich eine TZR-Aktivierung durch mindestens eine Anhäufung von grün fluoreszierenden T-Zellen in beiden unabhängigen Ansätzen wurde eine positive Reaktivierung bestätigt.

Es führten von allen 24 isolierten Plasmiden der COS-B27-Zellen fünf zu aktivierten TZR-Transfektanten. Bei den anderen 19 subklonierten Plasmiden konnte nach Stimulation keine Reaktivierung der TZR-Hybridomzellen festgestellt werden. Diese peptidkodierenden Plasmide wurden dementsprechend nicht weitergeführt.

Nur die TZR^{ReA}-Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP zeigte eine signifikante Reaktivierung durch die subklonierten Plasmid-kodierten Peptide. Folgende fünf Plasmid-kodierten Peptide wurden weiter analysiert und stammen jeweils von den angegebenen isolierten pCOS-B27-Zellen (in Klammern ist die Anzahl der aktivierten TZR-Hybridomzellen bei der Isolierung angegeben):

- Nr. 4.1: COS-B27-Zelle mit pcDNAlib-N27; kodiert Nonamer (2 aktivierte TZR-Zellen)
- Nr. 8.2: COS-B27-Zelle mit pcDNAlib-N24; kodiert Oktamer (5 aktivierte TZR-Zellen)
- Nr. 8.3.2: COS-B27-Zelle mit pcDNAlib-N24; kodiert Oktamer (7 aktivierte TZR-Zellen)
- Nr. 9.1.3: COS-B27-Zelle mit pcDNAlib-N24; kodiert Oktamer (14 aktivierte TZR-Zellen)
- Nr. 9.1.4: COS-B27-Zelle mit pcDNAlib-N24; kodiert Oktamer (14 aktivierte TZR-Zellen)

Eine Reaktivierung der V α 3V β 1-Transfektanten zeigte sich bei vier Zellen, die mutmaßlich ein Oktamer auf HLA-B27 präsentieren. Deren ursprünglich isolierte pCOS-B27-Zelle wurde durch eine größere Anzahl von 5, 7 oder 14 aktivierten TZR-Hybridomzellen markiert. Die erste pCOS-B27-Zelle Nr. 4.1 wurde nur von zwei grün leuchtenden TZR-Zellen gekennzeichnet, wobei trotzdem eine Isolierung stattfand. Diese Zelle beinhaltet peptidkodierende Plasmide, die Nonamere exprimieren. Die Zellen 9.1.3 und 9.1.4 stammen von der gleichen Anhäufung von 14 grün fluoreszierenden TZR-Hybridomen. Hier wurden vier verschiedene darunter liegende COS-B27-Zellen einzeln entfernt um sicherzustellen, dass das positive antigenkodierende Plasmid isoliert wurde. Die beiden anderen Zellen dieser Isolierung (9.1.1 und 9.1.2) führten zu keiner Reaktivierung, was zur Annahme führte, dass das positive Antigen mit einer starken TZR-Aktivierung durch die Zellen 9.1.3 und 9.1.4 präsentiert wurde.

Damit in der heterogenen Population unterschiedlicher peptidkodierender Plasmide das positive Antigen bestimmt werden kann und schließlich ein Einzelklon des positiven Plasmids vorliegt, wurde daraufhin die ursprüngliche Bakterienkultur in Bakterien-Subpools unterteilt. Mit wiederholten Reaktivierungsschritten mittels isolierter Plasmid-DNS der Bakterien-Subpools wurde das positive Antigen angereichert. Das bedeutet im Detail, dass in einem Reaktivierungsschritt von einem Bakterien-Subpool in 30 unabhängigen Ansätzen Plasmid-DNS isoliert wurde und diese nach Transfektion in COS-B27 und nach TZR-Stimulierung im Fluoreszenzmikroskop auf eine TZR-Aktivierung hin untersucht wurden. Dabei konnte bei jeder Reaktivierung mindestens eine positive Plasmid-DNS, welche durch grün fluoreszierende TZR-Hybridome signalisiert wurde, im Gegensatz zu 29 entsprechend negativen peptidkodierenden Plasmiden gefunden werden. Von der jeweils positiven Plasmid-DNS wurde erneut eine Unterteilung der Bakterienkultur gebildet, damit die Anzahl der vorhandenen heterogenen Plasmide innerhalb einer Bakterienkultur bei jedem weiteren Schritt verringert wurde bis schließlich Einzelklone nach Ausplattieren auf Agarplatten isoliert werden konnten. Das positive Antigen der Einzelklone wurde nach erfolgreicher Reaktivierung verifiziert und anschließend sequenziert.

Die Abbildung 20 zeigt beispielhaft die finale Reaktivierung der 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten mit einem Einzelklon des Plasmid-kodierten positiven Antigens 8.3.2-1 der isolierten pCOS-B27-Zelle Nr. 8.3.2 (unteres Bild). Die Negativkontrollen werden in den drei oberen Bildern gezeigt, bei denen keine TZR-Aktivierung sichtbar ist. Zum einen wurden die TZR-Transfektanten mit COS-B27 stimuliert ohne Transfektion eines Plasmid-kodiertes Antigens (NK-1). Zum anderen zeigte die Transfektion des positiven Plasmid-kodierten Antigens 9.1.3-2 in untransfizierte COS-7 (ohne HLA-B27) nach einer Stimulierung keine TZR-Aktivierung (NK-2). Ebenfalls wurden die TZR-Transfektanten nicht durch HLA-B27 mit dem Leervektor pcDNAspacer, der als Expressionsvektor für die Peptidbibliotheken verwendet wurde, aktiviert.

Beim letzten Reaktivierungsschritt der Einzelklone zeigte sich, dass von 30 analysierten Einzelklonen mehr als eine Plasmid-DNS zu einer positiven TZR-Aktivierung führte. Jede positive Plasmid-DNS des Einzelklons, der die Aktivierung der TZR^{ReA}-Transfektanten induzierte, wurde daraufhin sequenziert. Die nachfolgende Sequenzanalyse der Plasmid-DNS wird im nächsten Abschnitt 6.4.5 angeführt.

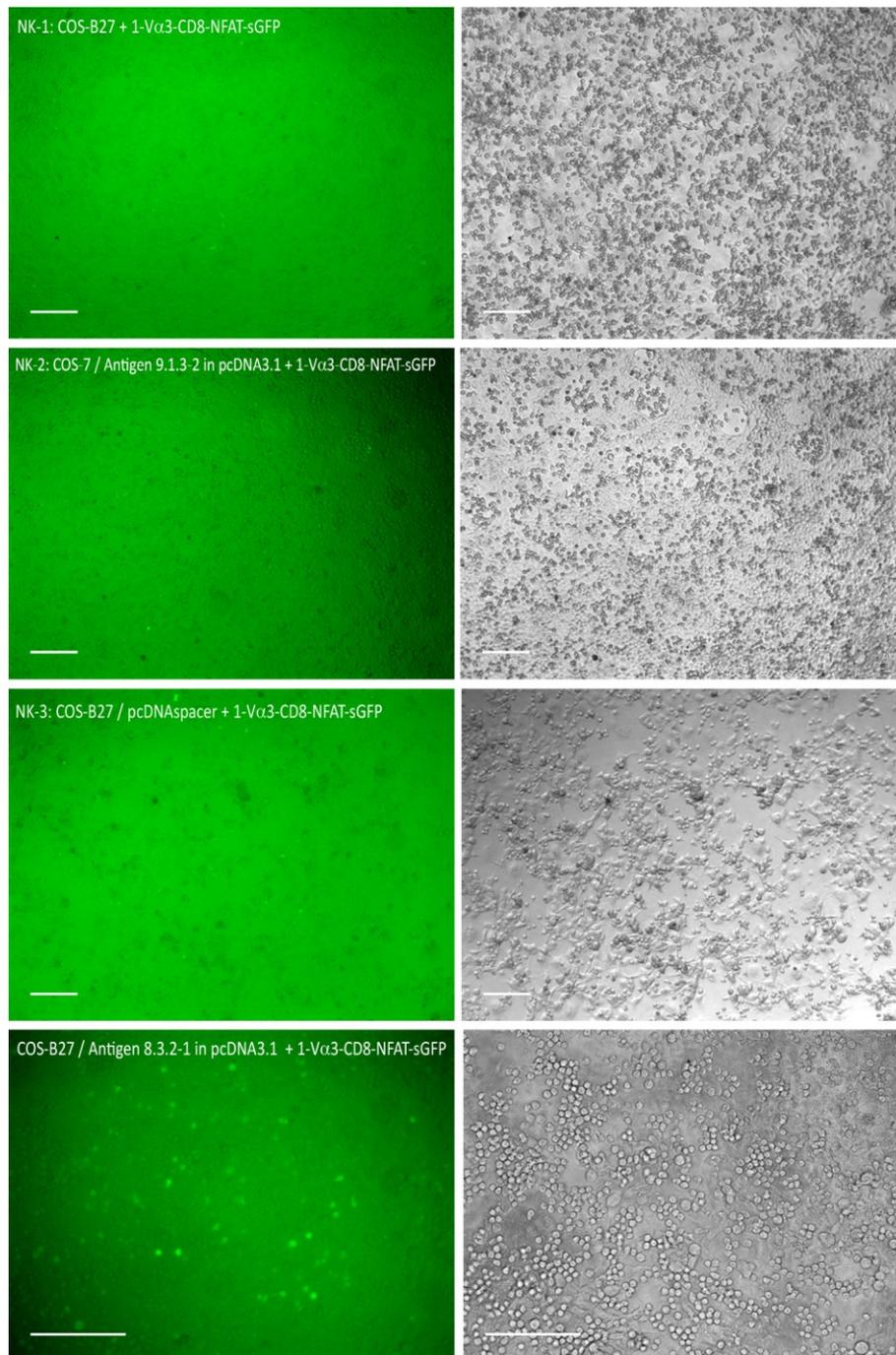


Abbildung 20: Aktivierung der 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP Hybridomzellen durch HLA-B27 präsentierte Plasmid-kodiertes Antigen 8.3.2-1

Die Analyse der Plasmid-kodierten Antigene der isolierten pCOS-B27-Zelle Nr. 8.3.2 durch wiederholte Reaktivierungsschritte der 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten mit Plasmid-Subpools und Anreicherung des positiven Plasmid-kodierten Antigens führte zur Identifikation des positiven Antigens 8.3.2-1 eines Einzelklons (Antigen 8.3.2-1 in pcDNA3.1-TOPO). Das untere Bild links zeigt die positive Aktivierung der TZR-Transfektanten nach Stimulation mit Antigen 8.3.2-1 in pcDNA3.1-TOPO transfizierte COS-B27. Die oberen drei Bilderpaare sind Negativkontrollen, wo jeweils keine TZR-Aktivierung detektiert werden konnte. NK-1 zeigt die Stimulierung der TZR-Transfektante mit COS-B27 ohne Plasmid-kodierte Peptide, NK-2 zeigt die Stimulierung mit COS-7 (ohne HLA-B27), die mit dem positiven Antigen Nr. 9.3.1-1 in pcDNA3.1-TOPO transfiziert wurden und NK-3 zeigt die Stimulierung mit COS-B27, die mit dem Leervektor pcDNAspacer (ohne Insertion einer cDNS-Peptidbibliothek) transfiziert wurden.

Der identische Bildausschnitt ist jeweils im Fluoreszenzkanal für GFP (links) und im Durchlicht (rechts) dargestellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m.

6.4.5 Sequenzanalyse der identifizierten potentiellen TZR^{ReA}-Epitope

Die Untersuchung der Plasmid-kodierten Peptide der fünf isolierten pCOS-B27-Zellen, die zu einer positiven Reaktivierung der TZR^{ReA}-Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP mit Hilfe des Subklonierungsvektors pcDNA3.1-TOPO geführt hatten und anschließender Anreicherung des positiven Plasmids durch aufeinander folgende Reaktivierungsschritte führte zur Identifikation mehrerer positiver Einzelklone. Die homogenen Plasmide dieser Einzelklone zeigten nach Stimulierung der TZR^{ReA}-Transfektante jeweils eine TZR-Aktivierung. Jede gewonnene positive Plasmid-DNS wurde daraufhin zur Bestimmung der Sequenz der Peptidinsertion mit den Primern pcDNA-for-1 und pcDNA-rev-1 sequenziert, die in pcDNA3.1-TOPO die Einklonierungsstelle flankieren.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Aufgelistet sind dabei alle Einzelklone der positiven Plasmid-DNS für jede ursprünglich isolierte pCOS-B27-Zelle sowie die Aminosäuresequenz einer vorhandenen Peptidinsertion.

Tabelle 5: Sequenzanalyse der positiven Einzelklone zur Bestimmung der peptidkodierenden Insertion

Erfasst sind jeweils die positiven Plasmid-DNS der Einzelklone von ursprünglich fünf isolierten pCOS-B27-Zellen, die zu einer TZR-Aktivierung der TZR^{ReA}-Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP geführt haben. Dazu ist angegeben, ob eine Insertion im Subklonierungsvektor pcDNA3.1-TOPO vorliegt sowie die kodierte Aminosäuresequenz (* kennzeichnet ein Stopp) ohne das Methionininitiationskodon, wobei die potentiell funktionellen Oktamere fett hervorgehoben sind. Zur Vereinfachung der Bezeichnung ist rechts noch die neue Bezeichnung dieser vier Mimotope aufgeführt.

Isolierte pCOS-B27-Zelle	Bezeichnung der positiven Plasmid-DNS	Insertion	Aminosäuresequenz der Peptidinsertion	Bezeichnung des Mimotops
Nr. 4.1:	4.1.19.1.6.4.1.9 4.1.19.1.6.4.1.17 4.1.19.1.6.4.1.10	Deletion ab Pos. 934 -> 3581 Deletion ab Pos. 934 -> 3581 Deletion ab Pos. 934 -> 3607	—	—
Nr. 8.2	8.2.2.9.9.7.4.14 8.2.2.9.9.7.4.4 8.2.2.9.9.7.4.19	Peptid in pcDNA3.1 -> Stopp Deletion ab Pos. 934->3451 Deletion ab Pos. 934->3451	EF*NK*DS — —	—
Nr. 8.3.2	8.3.2.4.1.5 8.3.2.4.1.4	2 Peptide in pcDNA3.1 pcDNA3.1, ohne Insertion	1 . TGARDFEC 2 . ERSFT*TV	8.3.2-1 —
Nr. 9.1.3	9.1.3.7.3.6.6 9.1.3.7.3.6.15 9.1.3.7.3.6.16 9.1.3.7.3.6.8.1 9.1.3.7.3.6.8.7 9.1.3.7.3.6.30	Peptid in pcDNA3.1 Peptid in pcDNA3.1 Peptid in pcDNA3.1 Peptid in pcDNA3.1 -> Stopp Peptid in pcDNA3.1 -> Stopp Peptid in pcDNA3.1 -> Stopp	GCTMMKVG ERAVSKGG NGALWWIR VP*MWERT EKS*GSHR REY*EFLV	9.1.3-1 9.1.3-2 9.1.3-3 — — —
Nr. 9.1.4	9.1.4.5.8.4 9.1.4.5.8.5 9.1.4.5.8.8 9.1.4.5.8.9	Deletion ab Pos. 934->3581 Deletion ab Pos. 934->3581 Deletion ab Pos. 934->3581 Deletion ab Pos. 934->3487	—	—

Die Sequenzanalyse offenbarte ein unerwartetes Ergebnis. Zum einen konnten von drei isolierten pCOS-B27-Zellen Nr. 4.1, 8.2 und 9.1.4 jeweils neun positive Einzelklone identifiziert werden, die keine peptidkodierende Insertion im Subklonierungsvektor pcDNA3.1-TOPO aufwiesen. Der 5,5 kb große Vektor ist jeweils durch Deletionen an der Einklonierungsstelle für eine gerichtete Klonierung mit Hilfe der CACC-Sequenz (Position 934) um 2,7 kb verkürzt. Vier verschiedene Deletionen in einem ähnlichen Bereich von 150 bp im Vektor pcDNA3.1-TOPO (Positionen 3451, 3487, 3581 und 3607), führten jeweils zu einem 2,8 kb großen Plasmid, dem die Sequenzen für den SV40-Replikationsursprung, dem Neomycin-Resistenzgen und dem SV40-Polyadenylierungssignal fehlen. Die für die Replikation in Bakterien wichtigen Gene für die Ampicillin-Resistenz und der Replikationsursprung pUCori sind jedoch vorhanden. Jede Plasmid-DNS der Einzelklone von Nr. 4.1 und Nr. 9.1.4 zeigte den deletierten Vektor, wobei davon vier Klone identisch sind (4.1.19.1.6.4.1.9, 4.1.19.1.6.4.1.17, 9.1.4.5.8.4, 9.1.4.5.8.5 und 9.1.4.5.8.8). Der Nachweis der deletierten Plasmide wurde bei der Sequenzierung der fehlenden Peptidinsertion festgestellt und wurde bei einer Größenbestimmung durch eine Linearisierung mit dem singular schneidenden Restriktionsenzym *Bam* HI bestätigt (Daten nicht gezeigt). Bei der isolierten pCOS-B27 Zelle 8.2 ergab die Sequenzierung der positiven Plasmid-DNS zweier Einzelklone den deletierten Vektor pcDNA3.1-TOPO (8.2.2.9.9.7.4.4 und 8.2.2.9.9.7.4.19). Bei der dritten Sequenz des Einzelklons 8.2.2.9.9.7.4.14 konnte zwar eine Peptidinsertion aufgrund korrekter Subklonierung festgestellt werden, deren Nukleotidsequenz jedoch zwei Stoppkodone aufwies. Dieses Peptid bestünde aus zwei Aminosäuren und ist deshalb von einer Präsentation auf HLA-I-Molekülen auszuschließen.

Zum anderen deckte die Sequenzierung der Plasmid-DNS positiver Einzelklone noch andere Besonderheiten auf, die bei dieser Methode zur Identifizierung des positiven Antigens nicht zu erwarten waren. Das Ergebnis der Sequenzierung zweier positiver Einzelklone der isolierten pCOS-B27-Zelle Nr. 8.3.2 zeigt zwei unterschiedliche Gegebenheiten im Subklonierungsvektor auf. Klon 8.3.2.4.1.4 entspricht dem Vektor pcDNA3.1-TOPO ohne Insertion eines Amplifikats zur Kodierung eines Peptids. Die Stelle für eine gerichtete Einklonierung des Amplifikats an Position 934 wurde nach einer Auffüll-Reaktion der überhängenden Enden mit den glatten 3'Enden religiert. Die andere Sequenz des Klons 8.3.2.4.1.5 wies zwei hintereinander liegende Nukleotidsequenzen kodierend für zwei Peptide auf. Das bedeutet, dass durch die Insertion eines Cytosins in der *Not* I Schnittstelle die Sequenz der *Asc* I-Schnittstelle ligiert wurde und zwei verschiedene kodierende Peptidsequenzen anschließen. Dabei beinhaltet die strangabwärts liegende Sequenz ein Stoppkodon, was zur Expression eines verkürzten Peptids von fünf Aminosäuren führt. Dieses strangabwärts liegende zweite Transkript würde zum einen wahrscheinlich gar nicht translatiert werden und zum anderen nicht auf HLA-B27 präsentiert werden und ist deshalb als exprimiertes Peptid auszuschließen. Strangaufwärts kodiert die erste Peptidsequenz ein funktionelles Oktamer, welches im Weiteren als Antigen Nr. 8.3.2-1 bezeichnet wird.

Die Analyse der Plasmid-DNS der isolierten pCOS-B27-Zelle Nr. 9.1.3 führte zu sechs positiven Einzelklonen, deren DNS eine Aktivierung der TZR^{ReA}-Transfektanten forcierte. Es konnte nach der Sequenzierung festgestellt werden, dass bei diesen Plasmid-DNS korrekte Subklonierungen in pcDNA3.1-TOPO erfolgt waren und die Peptidinsertionen entsprechend jeweils ein Oktamer kodieren. Drei Nukleotidsequenzen führen jedoch wiederum durch

Stoppkodone zu verkürzten Peptiden von einer Länge von zwei bis fünf Aminosäuren, die von einer Prozessierung auf HLA-I-Molekülen ausgenommen sind (9.1.3.7.3.6.8.1, 9.1.3.7.3.6.8.7 und 9.1.3.7.3.6.30). Die anderen drei führen zu potentiell funktionellen Oktameren, die als Mimotope 9.1.3-1, 9.1.3-2 und 9.1.3-3 definiert werden und möglicherweise einem TZR^{ReA} Antigen ähneln.

Zusammenfassend ergab die Sequenzanalyse positiver Einzelklone keine homologe Peptidsequenz, sondern es wurden vier verschiedene Peptidoktamere aufgezeigt. Weiterhin wurden auch Reaktivierungen mit Plasmiden ohne Insertion bzw. mit Deletionen erhalten und solchen, deren Insertionen interne Stoppkodone enthielten.

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen dieser vier Peptidoktamere (Mimotope) ist in Abbildung 21 zum besseren Vergleich aufgelistet.

Mimotop	Aminosäuresequenz der Oktamere	Nukleotidsäuresequenz der Oktamere
8.3.2-1	T G A R D F E C	ACG GGG GCG CGG GAT TTT GAG TGT
9.1.3-1	G C T M M K V G	GGG TGT ACG ATG ATG AAG GTG GGG
9.1.3-2	E R A V S K G G	GAG AGG GCG GTG TCT AAG GGG GGG
9.1.3-3	N G A L W W I R	AAT GGT GCG TTG TGG TGG ATT CGG

Abbildung 21: Aminosäure- und Nukleotidsäuresequenz der identifizierten Mimotope

Die Sequenzanalyse der Plasmid-kodierten Peptide, die eine TZR-Aktivierung der 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP-Transfektanten induzierten, führte zur Identifikation von vier Mimotopen, deren Oktamerpeptid potentiell als Antigen auf HLA-B27 präsentiert wird. Dargestellt sind jeweils die Aminosäure- und Nukleotidsäuresequenzen, wie sie als Insertion im Subklonierungsvektor pcDNA3.1-TOPO vorlagen.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier Mimotope ergibt keine Übereinstimmung einer Aminosäure an einer bestimmten Position. Nur das Peptid 9.1.3-2 kodiert den HLA-B27-spezifischen Anker Arginin an Position 2. An Position 3 tritt jedoch bei drei der vier Mimotope ein Alanin (A) auf. Antigen 9.1.3-1 und 9.1.3-2 hat an zwei Positionen identische Aminosäuren (K an Position 6 und G an Position 8). Es kann generell kein klar definiertes Konsensusmotiv festgestellt werden, was Hinweise auf ein einziges TZR^{ReA} Antigen liefert. Da alle vier Peptide zu einer TZR-Aktivierung führten, ist anzunehmen, dass der TZR V α 3V β 1 auf alle reagiert.

Die drei positiven Einzelklone, die ursprünglich von einer COS-B27 Zelle Nr. 9.1.3 stammten, sind darüber hinaus untereinander verschieden, was den Rückschluss auf ein singuläres Antigen erschwert. Welches Plasmid-kodierte Peptid die TZR-Aktivierung ursprünglich bei der Antigensuche induziert hat und daraufhin aus der COS-B27 (Nr 9.1.3) isoliert wurde, kann nicht festgestellt werden. Ausgeschlossen ist hingegen nicht, dass alle drei Oktamerpeptide exprimiert worden sind und unabhängig voneinander die Aktivierung bewirkt haben könnten. Das lässt sich aufgrund des degenerierten TZR, der eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene erkennt, erklären.

7 Diskussion

Die seit vielen Jahren bekannte Assoziation von HLA-B27 mit den Erkrankungen der SpA führte zu zahlreichen Theorien mit dem Ziel eine Entstehung von Autoreaktivität mit einer Beteiligung von HLA-B27 zu erklären. Trotz intensiver Studien, die von auffälligen Eigenschaften des HLA-B27-Moleküls selbst über Besonderheiten des gebundenen Peptidrepertoires bis hin zur Entdeckung weiterer genetischer Assoziationen reichen, konnte noch kein Pathomechanismus eindeutig verantwortlich gemacht werden. Eine zentrale Rolle spielen dabei die unterschiedlichen Peptidbindeeigenschaften der verschiedenen krankheitsassoziierten und nicht-assoziierten Subtypen von HLA-B27, die sonst die gleichen biochemischen Eigenschaften aufweisen. Die Peptidbindung ist entscheidend sowohl für die Faltung und Stabilität des Moleküls als auch für die T-Zell-Erkennung und somit für die Induktion der Immunantwort. In den Focus der Forschung tritt immer mehr die Suche nach HLA-B27-gebundenen Antigenen, die autoreaktive ZTL zum Angriff körpereigener Zellen veranlassen.

Die vorliegende Arbeit stellte die Frage, welches HLA-B27-restringiertes Antigen eine Infiltration und Proliferation von autoreaktiven CD8⁺ ZTL ins Gelenk bewirkt hatte und somit ein Auslöser der Autoimmunkrankheit der ReA wäre. Es wird vermutet, dass die Antigen-spezifischen T-Zellen in der Peripherie durch ein bakterielles Antigen stimuliert wurden und im Gelenk nach Erkennung eines Autoantigens körpereigene Zellen angreifen. Die Herangehensweise, das verantwortliche Epitop mit Hilfe von CD8⁺ T-Zellen, die in die Gelenkregion infiltrierten und klonal expandiert auftraten, zu identifizieren, birgt einige Vorteile. Die Einwanderung von ZTL ins sterile Gelenk weist auf eine direkte Beteiligung der T-Zellen an der Entzündungsreaktion hin, wobei dem TZR eine pathogene Funktion zugeteilt wird. Einer Studie im Tiermodell von Diabetes I zufolge erlaubte den Schluss, dass hauptsächlich nur autoreaktive CD8⁺ T-Zellen und keine naiven oder nicht beteiligten T-Zellen an der autoimmunen Entzündungsstelle auftreten, was abhängig vom lokalen Vorhandensein des spezifischen Autoantigens (pMHC-I) sei (Wang et al., 2010).

Eine klonale T-Zell-Expansion spiegelt schließlich die Anwesenheit eines antigenen Peptids in vivo wider, aufgrund dessen die T-Zellen zur Proliferation angeregt wurden. Die Charakterisierung der spezifischen TZR und vor allem der $\alpha\beta$ -CDR3-Regionen, die direkt an der Antigen-MHC-Interaktion beteiligt sind, erlauben dabei Rückschlüsse auf das erkannte Peptid.

Vorangegangene Studien zeigten unabhängig voneinander die klonale Expansion der ZTL in Synovialflüssigkeit und die Verwendung eines spezifischen Sequenzmotivs in der CDR3-Region der V β 1J β 2.3-Kette des TZR bei HLA-B27⁺ Patienten von ReA (Hermann et al., 1993; Duchmann et al., 1996; Dulphy et al., 1999; Barber et al., 1996; May et al., 2002). Die Übereinstimmung der CDR3-Sequenz in 15 Individuen resultierte in der Definition einer kanonischen ReA-assoziierten TZR β -Konsensussequenz. Für die vorliegende Arbeit standen die RNS oder cDNS der Synovialzellen von fünf Patienten mit akuter ReA zur Verfügung, bei denen die CDR3-Sequenz der klontypischen TZR β -Kette in May et al., (2002) nachgewiesen wurde. Im ersten Teil der Diskussion werden die Ergebnisse zur Analyse der TZR β ^{ReA}-assoziierten α -Ketten aufgegriffen und im zweiten Teil steht die Suche nach einem arthritogenen Peptid anhand der rekonstruierten TZR^{ReA}-Kandidaten im Vordergrund.

7.1 Charakterisierung der TZR^{ReA}-Kandidaten-Ketten

Der Nachweis der konservierten klontypischen V β 1J β 2.3-Kette wies dem TZR eine pathogene Funktion bei der ReA zu. Jedoch fehlte die Kenntnis der damit assoziierten α -Kette, und nur durch die Paarung des pathogenen TZR $\alpha\beta$ -Heterodimers kann eine Suche nach einem arthritogenen Peptid erfolgen. Außerdem postulieren einige Studien sogar eine dominante Rolle der α -Kette bei der Antigenerkennung (Mantovani et al., 2002; Dietrich et al., 2003; Hamrouni et al., 2003). In Kristallstrukturanalysen des trimeren TZR-pMHC hat die α -Kette häufiger Kontakt mit dem antigenen Peptid und stellt damit den überwiegenden Part zur Peptid-MHC-Erkennung dar. Bei HLA-B27-restringierten kreuzreaktiven ZTL-Klonen gegen zwei verschiedene autologe Peptide mit unterschiedlichen Bindungskonformationen wird spezifisch die CDR3 α -Region für die Kreuzreaktion der Antigenerkennung verantwortlich gemacht (Rückert et al., 2006).

7.1.1 Identifizierung der TZR $\alpha\beta$ -Kandidaten-Ketten von ReA-Patienten

Um mit einem Ausgangsmaterial von RNS eine Überrepräsentation einer α -Kette aufzudecken, die mit dem TZR β ^{ReA}-T-Zell-Klon assoziiert ist, bot sich die Methode der CDR3-Spektratypisierung an. Der Nachweis der monoklonalen Expansion der klontypischen V β 1^{ReA}-Kette war bereits durch CDR3 β -Spektratypisierung erbracht worden (May et al., 2002). Zu Beginn der Untersuchungen war diese Methode nur für β -Ketten etabliert (Pannetier et al., 1995), jedoch noch nicht für TZR α -Ketten aufgrund der hohen Anzahl an JA-Elementen (Dornmair et al., 2003). Die Längenvariationen der antigenspezifischen CDR3 α -Regionen wurden deshalb zuerst anhand von VA-CA-Transkripten analysiert (Han et al., 1999) und im weiteren Verlauf detaillierter auf VA-JA-Umlagerungen ausgeweitet.

Basierend auf den Vorarbeiten aus der vorangegangenen Diplomarbeit wurden sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten definiert (siehe Abschnitt 4.1.6, S. 28f). Dort konnte gezeigt werden, dass bei V β 1⁺Synovial-T-Zellen einer ReA-Patientin, bei denen die klontypische Expansion der TZR^{ReA} β -Kette vorlag und die deshalb auf die V β 1-Kette sortiert wurden, das α -Ketten-Repertoire stark eingeschränkt war. Auffällig war, dass alle vorhandenen Transkripte der TZR der variablen bis zur konstanten Region der α -Kette (VA-CA, unabhängig der JA-Elemente) in der Spektratypisierung monoklonal expandiert vorlagen und ihre Sequenzen funktional waren (Schönwetter-Steer, 2005).

In den Synovialzellen weiterer Patienten wurden darum nur nach diesen sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten gesucht. Eine monoklonale Expansion der α -Kandidaten-Kette war hier nicht zu erwarten, da nur ein Teil der unsortierten Zellen V β 1⁺TZR exprimierten. Die Frequenz der klontypischen T-Zellen in Synovialflüssigkeit wird bei der frühen akuten Reaktiven Arthritis mit 7,0 bis 12,5 % CD8⁺V β 1⁺ T-Zellen angegeben (Dulphy et al., 1999). Eine Aussage über den Anteil des V β 1⁺T-Zell-Klons in den hier verwendeten SF-Populationen kann nicht erfolgen, da nur bereits vorhandene cDNS verwendet werden konnte. Es konnte ein oligoklonales CDR3-Repertoire in verschiedenen ReA-Patienten nachgewiesen werden, wobei

bei einigen α -Ketten eine Verschiebung der Normalverteilung zu dominanten Spitzen auf expandierte CDR3-Längen hindeuteten (siehe Abbildung 7, S. 62). Keine der untersuchten TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten konnte jedoch als singulär, monoklonal expandierte festgehalten werden, die gleichlang zur Referenzlänge der Kandidaten-Kette gewesen wäre. Ein Vorkommen einer identischen VA-JA-Umlagerung bei mehreren Patienten hätte eine α -Kette als Kandidat für den vollständigen $\alpha\beta$ -TZR eines ZTL-Klons im Gelenk stark favorisiert.

Die 25 VA-JA-Transkripte, die gleich lange CDR3-Regionen durch dominant verschobene Spitzen in der Spektratypisierung aufwiesen und deshalb von besonderem Interesse waren, wurden näher analysiert und schließlich sequenziert (siehe Tabellen 2, S. 67f). Verschiedene Sequenzen gleicher Länge in der Spektratypisierung zeigen hier auf, dass eine Sequenzierung unabdingbar ist, um eine monoklonale Expansion nachzuweisen. Der Vergleich der Sequenzen zeigt keine dominante CDR3-Region pro VA-JA-Transkript auf. Eine Aussage zur Häufigkeit der vorkommenden α -Ketten ist nicht möglich, dazu wäre eine höhere Anzahl sequenzierter CDR3-Regionen nötig.

Prinzipiell gleichen sich die CDR3-Regionen durch ähnliche Aminosäuren, jedoch konnte keine der sechs TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten vorrangig als Partner der klontypischen β^{ReA} -Kette bestimmt werden. Aus den analysierten α -Ketten seien hier drei Auffälligkeiten herausgegriffen:

Bei zwei TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten, VA3JA28 und VA23JA20, wurden mit Hilfe des Vergleichs der CDR3-Regionen identische α -Ketten in peripheren Blutzellen eines gesunden HLA-B27⁺ Individuums (Nr. 7) gefunden. In den peripheren Blutzellen ist zwar die Nähe zum Entzündungsort nicht unbedingt gegeben und die Person zeigte keine Krankheitserscheinung, doch kommen diese α -Ketten auch nicht monoklonal expandiert vor, sondern treten mit anderen VA-JA-Transkripten auf. Eine Erklärung wäre das Vorhandensein einer autoreaktiven T-Zelle in der Peripherie, die bei einer Infiltration ins Gelenk auf ihr stimulierendes Antigen trifft, was zur Proliferation und Aktivierung der T-Zell-Effektorfunktionen führe. Die monoklonal expandierte α -Kette, mit potentiell pathogener Funktion, wurde im Gelenk bei der ReA-Patientin nachgewiesen. Außerdem könnten die α -Ketten ein Hinweis auf einen TZR mit HLA-B27-Restriktion sein.

Zu erwähnen ist auch das Vorkommen einer gleich langen α -Sequenz mit sehr ähnlichen CDR3-Regionen von VA12JA24 bei drei verschiedenen Patienten (Nr. 14SF und 14PB, 15 und 21), die drei Aminosäuren länger als die Referenzlänge des α -Kandidats sind (siehe Tabellen 2b). Die CDR3-Regionen wurden durch dominante Spitzen in der Spektratypisierung aufgedeckt und deuten auf eine klonale strukturell ähnliche α -Kette hin. Zudem weist das Vorhandensein sowohl im peripheren Blut als auch in den SF-Zellen des ReA-Patienten Nr. 14 auf eine α -Kette eines potentiell autoreaktiven TZR hin. Die weitere Charakterisierung dieser α -Kette könnte von Interesse sein.

Schließlich ist noch die identische CDR3-Region der TZR α -Kette VA25JA52 in Synovial-T-Zellen zweier ReA-Patienten (in der $V\beta 1^+$ T-Zell-Population von 006-2.5.2.1 und in unsortierten Synovial-T-Zellen von Nr. 21; siehe Tabellen 2d) bedeutsam, was einer klonalen Expansion entspricht. Auffallend ist, dass identische CDR3-Aminosäuren von unterschiedlichen Triplets kodiert werden, was auf unterschiedliche T-Zellklone in der Ausgangspopulation hinweist. In diesem Zusammenhang erscheint auch der Vergleich dieser TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten VA25JA25 mit veröffentlichten Nukleotidsequenzen von TZR bezeich-

nend (siehe Abschnitt 6.1.1.3, S. 71). Denn diese Umlagerung wurde in HLA-B27 alloreaktiven ZTL von Barber et al. (1996) beschrieben, stimmt in der CDR3-Länge überein und weist lediglich zwei Aminosäuresubstitutionen auf (siehe Tabelle 3e, S. 72). Dieser Studie entstammt auch die alloreaktive TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette der vorliegenden Arbeit. Jedoch konnte für diese TZR β -Kette in dieser Arbeit keine HLA-B27-Alloerkennung nachgewiesen werden.

Darüber hinaus weist keine der sechs TZR α^{ReA} -Ketten vollständige Homologie zu Sequenzen in der Datenbank auf.

Welche α -Kette nun mit dem klontypischen ReA-T-Zell-Klon den pathogenen TZR ausbildet konnte nicht definitiv festgestellt werden, da die Verwendung einer T-Zellpopulation als Ausgangsmaterial die Unterscheidung erschwert. Weiterhin können zwei verschiedene funktionelle α -Ketten mit einer identischen β -Kette auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert werden, da kein allelischer Ausschluss am TZR α -Genlocus erfolgt (Padovan et al., 1993; Kekäläinen et al., 2010). T-Zellen mit dualen TZR und zwei verschiedenen Antigen-spezifitäten werden aufgrund der Kreuzreaktivität präferenziell als Verursacher von Autoimmunität angesehen (Ji et al., 2010; Kim et al., 2012).

Letztendlich muss gezeigt werden, dass die identifizierten α^{ReA} -Kandidaten-Ketten mit der klontypischen β^{ReA} -Kette zu einem funktionellen TZR zusammengesetzt werden können, was für fünf α^{ReA} -Kandidaten zutrifft. Vorrangig wäre aber eine Charakterisierung von TZR bei Einzelzellen, da hier die gepaarten $\alpha\beta$ -Heterodimere aufgedeckt werden können. Die hier angewandte Analyse vorhandener Einzelzellen war wenig hilfreich, da durch die vorangegangene Stimulierung möglicherweise die Expansion HLA-B27 alloreaktiver Zellen propagiert wurde. Das Auftreten der alloreaktiven TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette in sämtlichen Einzelzellen unterstützt dies (Prinz, 2007). Es wurde jedoch eine Multiplex-PCR aller VA-Gen-segmente etabliert, die bei Erhalt frischer SF-Zellen eines ReA-Patienten einsetzbar ist.

Bei zwei von neun untersuchten Einzelzellen konnte die VA12JA28 der α -Kandidaten-Kette amplifiziert und bestätigt werden (siehe Abschnitt 6.1.2.2, S. 75).

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stand ein begrenztes Patientenmaterial zur Verfügung. Zur Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse der TZR α^{ReA} -Kandidaten-Ketten wären frische Synovialzellen von ReA-Patienten vonnöten. Dies wurde jedoch im Rahmen der Promotion nicht erhalten. Denkbar wäre eine Vereinzelung durch Immobilisierung der SF-Zellen mittels Zytospin oder eine durchflusszytometrische Vereinzelung der Zellen und anschließender Mehrstufen-PCR an Einzelzellen zur Analyse der gepaarten $\alpha\beta$ -TZR-Ketten (Seitz et al., 2006; Kim et al., 2012).

Neuere Arbeiten stellen weitere Methoden vor, die hier interessant wären, um gepaarte $\alpha\beta$ -Moleküle einzelner T-Zellen in cDNS oder DNS zu untersuchen (Linnemann et al., 2013; Sun et al., 2012; Kobayashi et al., 2013).

7.1.2 Rekombinante Expression der TZR^{ReA}-Kandidaten-Ketten

Die Herstellung der rekombinanten TZR^{ReA}-Transfektanten gestattet es T-Zelllinien mit TZR singularer Spezifität über einen langen Zeitraum zu verwenden, um das erkannte Antigen ableiten zu können. Durch das Fehlen von endogenen TZR-Ketten der Maus-Hybridomzelllinie 58 α - β ⁻ ist sichergestellt, dass nur humane $\alpha\beta$ -Ketten der transfizierten Expressionsvektoren an der Zelloberfläche exprimiert werden (Dornmair et al., 2003). Die Mauszelllinie kann als Effektorzelle fungieren, da sie in Verbindung des Maus-CD3-Komplexes die Spezifität des humanen TZR erhält (Zumla et al., 1992; Wiendl et al., 2002). Zur stabilen Rezeptorzusammenlagerung und Signalweiterleitung wurden Hybridomzellen verwendet, die zusätzlich mit dem Gen der Maus CD3- ζ -Kette ausgestattet waren (Blank et al., 1993). Die TZR-Transfektanten umgehen damit die Notwendigkeit von oft schwer und limitierend kultivierbaren primären T-Zellen.

Dafür wurden die sechs TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten sowohl mit der klontypischen TZR β ^{ReA}-Kette und der alloreaktiven TZR β ^{HLA-B27}-Kette in dem Maus-Hybridom 58 α - β ⁻ koexprimiert. Die rekonstruierten $\alpha\beta$ -TZR-Moleküle bildeten die Grundlage, um nach potentiellen arthritogenen Peptiden zu suchen.

Fünf der sechs TZR α -Kandidaten-Ketten (VA3JA28, VA7JA24, VA12JA28, VA23JA20 und VA25JA52) konnten sowohl zusammen mit der TZR β ^{ReA}-Kette als auch mit der alloreaktiven TZR β ^{HLA-B27}-Kette nach Transfektion ihrer Expressionsvektoren zu stabilen funktionell aktiven TZR^{ReA}-Transfektanten etabliert werden (siehe Abschnitt 6.3.1.1, S. 81f). Der Nachweis erfolgte sowohl über die Oberflächenexpression der TZR-Komplexe (6.3.1.2, Abbildung 10, S. 83) als auch über die Fähigkeit nach TZR- bzw. CD3-Stimulation IL-2 zu produzieren (6.3.2, Abbildung 12, S. 85). Zusätzlich wurden die TZR^{ReA}-Hybridome noch mit dem humanen CD8-Heterodimer mit Hilfe einer Transduktion des Expressionsvektors ausgestattet, um eine bestmögliche Erkennung von pHLA-B27 zu gewährleisten (siehe Abschnitt 6.3.1.3, S. 83).

Der α -Ketten-Kandidat VA8JA7 wurde mit keiner der beiden exprimierten V β 1-Ketten an der Zelloberfläche exprimiert. Die kodierte α -Kette VA8VA7 ist vermutlich nicht funktional, da sie eine drastische Verkürzung am carboxyterminalen Ende der V-Domäne aufweist (statt 120 Aminosäuren der variablen Domäne einer TZR α -Kette hat diese nur 108 Aminosäuren). Die Vergleiche mit veröffentlichten Sequenzen von TZR α -Ketten zeigen auch keine starke Verkürzung auf (siehe Abschnitt 6.1.1.3, S. 71ff). Andererseits könnte auch eine Assoziation mit den V β 1-Ketten nicht möglich sein. Jedenfalls schließt eine fehlende Oberflächenexpression diese α -Kette als ReA-Kandidat aus.

Die als HLA-B27 alloreaktiv beschriebene TZR β ^{HLA-B27}-Kette (CDR3: CASSVGTSG) weicht von der klontypischen β ^{ReA}-Kette (CASSVGVYS) in drei Aminosäuren ab (Barber et al., 1996). Eine Alloreaktivität konnte in dieser Arbeit in Verbindung der TZR β ^{HLA-B27}-Kette mit fünf verschiedenen α -Ketten nicht nachgewiesen werden. Dies gilt auch für die entsprechenden TZR mit der klontypischen β ^{ReA}-Kette, da sie nicht mit HLA-B27⁺ COS-7-Zellen reagierten. Diese TZR β ^{HLA-B27}-Transfektanten wurden im Rahmen der Arbeit nicht weiter verwendet.

7.2 Aufdeckung potentiell arthritogener Peptide anhand von TZR^{ReA}-Kandidaten

Die Kenntnis eines antigenen T-Zell Epitops, das eine Immunantwort gegen autologe Zellen auslöst, ermöglicht es, die Immunpathogenese einer Autoimmunerkrankung zu erforschen. Darüber hinaus könnte ihre Kenntnis helfen therapeutische Ansätze zu entwickeln oder sogar eine Erkrankung durch Induktion einer Antigen-spezifischen Immuntoleranz zu verhindern. Deshalb wurden die im Gelenk klonal expandierten, identifizierten TZR^{ReA}-Kandidaten zur Suche nach einem antigenen Peptid verwendet. Geht man von der Hypothese eines arthritogenen Peptids aus, das aufgrund von molekularer Mimikry eine autoimmune Reaktion von kreuzreaktiven T-Zellen induziert, kann die Suche nach krankheitsauslösenden Antigenen in viele Richtungen erfolgen. Potentielle Antigene können infektiösen Ursprungs sein und weisen Ähnlichkeiten mit autologen Peptiden auf, die von Proteinen stammen, die spezifisch in der Gelenkregion vorkommen oder dort vermehrt vorhanden sind.

Vor dem Hintergrund der Assoziation mit nur einigen Subtypen von HLA-B27 wird zudem die Annahme bekräftigt, dass diese Epitope von HLA-B27 restringiert werden. HLA-B27-Allele, die nicht mit der Krankheit assoziiert sind, wären demzufolge nicht in der Lage arthritogene Peptide zu binden (McHugh und Bowness, 2012). Evidenz hierfür ist ein unterschiedliches Peptidrepertoire verschiedener HLA-B27-Subtypen (Sesma et al., 2002; Ramos et al., 2002a). Außerdem konnten vergleichende Röntgenstrukturanalysen aufdecken, dass ein gebundenes Selbst-Peptid Konformationsunterschiede bei verschiedenen Subtypen bedingt (Fiorillo et al., 2005; Hülsmeier et al., 2004). Da hier ein Autoantigen (pVIPR: RRKWRRWHL) durch molekulare Mimikry einem viralem Epitop von EBV (pLMP2: RRRWRRLTV) sowie einem weiteren Autoantigen des Glucagonrezeptors (pGR: RRRWHRWRL) ähnelt, wird die arthritogene Peptid-Hypothese unterstützt (Rückert et al., 2006). Eine Kreuzreaktivität der T-Zellen gegen diese Peptide konnten bei CD8⁺ T-Zellen von AS-Patienten, die das krankheitsassoziierte HLA-B27-Allel trugen, festgestellt werden, der definitive Nachweis bei der Pathogenese der AS fehlt jedoch (Fiorillo et al., 2000 und 2005).

Weitere Studien, die HLA-B27 restringierte CD8⁺ ZTL gegen bakteriell infizierte und uninfizierte Zellen in ReA- und AS-Patienten nachwiesen, bekräftigten die Hypothese kreuzreaktiver T-Zellen (Hermann et al., 1993). Spezifische HLA-B27-Liganden, die eine Autoinflammation induzieren, zu erfassen erweist sich jedoch oft methodisch schwierig, da zum einen nur geringe Mengen präsentierter Peptide während der Infektion vorhanden sind (Marcilla und López de Castro, 2008). Zum anderen lässt eine Identifikation von präsentierten bakteriellen Antigenen nicht zwangsläufig auf eine autoreaktive ZTL-Antwort schließen. Denn es wurden bereits immundominante Peptide von *Yersiniae* oder *Chlamydiae* in ReA-Synovialzellen gefunden, wohingegen die Kreuzreaktion dieser T-Zellen gegen Autoantigene nicht gezeigt werden konnte (Ugrinovic et al., 1997; Appel et al., 2004).

Viele Studien nähern sich der Schwierigkeit immundominante T-Zell-Epitope zu finden, indem sie Peptide *in silico* berechnen. Dabei werden nach Vorhersagen der Peptidspaltung

von Proteinen im Proteasom und der optimalen Peptidbeladung auf HLA-B27 Peptide ausgewählt, die schließlich auf eine T-Zell-Stimulation hin analysiert werden. Aufgrund einer induzierten ZTL-Antwort werden sie dann als immundominant definiert (Kuon und Sieper, 2003; Atagunduz et al., 2005). Proteine, die für eine Analyse von Zielantigenen interessant erscheinen und bei denen immundominante Epitope identifiziert werden konnten, sind dabei Proteome von Bakterien (Kuon et al., 2001; Cragolini et al., 2009; Alvarez-Navarro et al., 2013) oder gelenkspezifische Proteine wie im Knorpel (Kuon et al., 2004; Atagunduz et al., 2005). Zusätzlich für Untersuchungen geeignet waren auch vorhergesagte hypothetische Autoantigene, die von der schweren Kette des HLA-B27-Moleküls abstammen, Aminosäurehomologien zu Enterobakterien aufweisen und von HLA-B27 gebunden werden (Scofield et al., 1995; Frauendorf et al., 2003). Auch wenn die Peptide unterschiedlicher Herkunft zwar eine ZTL-Antwort auslösen konnten und einige von ihnen inzwischen nachweislich auf HLA-B27 präsentiert werden, ist jedoch bisher nicht erwiesen, dass sie in vivo als natürlicher HLA-B27-Ligand auftreten. Diese Daten beleuchten die Schwierigkeit ein arthritogenes Peptid bei der ReA zu identifizieren.

Einige der beschriebenen Antigene wurden in der Arbeitsgruppe und hier analysiert, ob sie von den identifizierten TZR^{ReA}-Kandidaten erkannt werden (siehe Abschnitt 6.3.4, S. 87). Das Peptid vom Proteoglykan Aggrecan ist ein extrazelluläres Matrixprotein aus dem humanen Knorpel und zeigte eine HLA-B27 restringierte antigenspezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort im HLA-B27-transgenen Mausmodell (Kuon et al., 2004). Eine T-Zell-Antwort gegen Aggrecan-epitope konnte auch im peripheren Blut von AS-Patienten nachgewiesen werden, wobei hier keine HLA-B27-Restriktion gefunden wurde (Zou et al., 2005; Appel et al., 2006). Die generierten rekombinanten TZR^{ReA}-Kandidaten wurden darüber hinaus im Rahmen der Diplomarbeit von Petra Prinz dafür verwendet sieben immundominant beschriebene Peptide aus *Chlamydia* auf potentielle Antigenität zu testen (Kuon et al., 2001; Prinz, 2007). Die TZR^{ReA}-Transfektanten zeigten keine Aktivierung, weder durch eine HLA-B27-restringierte Stimulation mit dem Peptid von Aggrecan (siehe Abschnitt 6.3.4, S. 87), noch mit den chlamydiellen Peptiden (die Sequenzen der getesteten Peptide ist im Anhang 9.6, S. 156 aufgeführt). Erste Versuche ein Epitop für die TZR^{ReA}-Kandidaten zu finden, um Hinweise für ein arthritogenes Antigen zu erlangen, blieben demzufolge erfolglos. Weitere bereits als immundominant beschriebene hypothetische Antigene anhand der hier identifizierten TZR^{ReA}-Kandidaten-Zellen auf eine Stimulation zu untersuchen, wurde wegen der großen Anzahl an potentiellen, aber vagen Kandidaten verzichtet.

Um die Auswahl an Analysen geeigneter Antigene nicht einzuschränken, erschien die sensitive Methode mittels Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken sehr zweckmäßig zu sein, unvoreingenommen an eine Antigen suche heranzugehen.

7.2.1 TZR-Aktivierung nach Verwendung von Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken

Mit Hilfe der rekombinanten TZR^{ReA}-Kandidaten in Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken nach dem passenden Peptid zu suchen, erlaubt es, nach der Identifizierung des stimulierenden Peptids, Rückschlüsse auf ein potentielles arthritogenes Antigen zu ziehen. Zumindest können Hinweise auf die natürlich vorkommende Zielstruktur der HLA-B27-restringierten T-Zell-Antworten gewonnen werden. Dabei nützt die Polyspezifität des TZR mehrere Peptide mit einigen Aminosäureaustauschen zu erkennen, so genannte Mimotope, anhand denen man letztendlich auf ein natürlich vorkommendes Antigen schließen kann (Wucherpfennig et al., 2007).

Da die bestmögliche Suche mit antigenpräsentierenden Zellen aus der entzündeten Gelenkregion nicht durchführbar ist, hat die Verwendung von kombinatorischen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken als Antigenquelle einige Vorteile (Siewert et al., 2012). Sie ermöglicht es, unvoreingenommen an die Suche nach einem arthritogenen Peptid heranzugehen und unter HLA-B27-Restriktion ein TZR-stimulierendes Peptid unter einer millionenfachen Zahl an APZ aufzudecken.

Die immortalisierten rekombinanten TZR-Hybridomzellen stehen unbegrenzt zur Verfügung, teilen sich unabhängig einer Antigenerkennung, können einfach transfiziert werden und umgehen damit der Verwendung von primären zytotoxischen T-Zelllinien aus peripherem Blut oder von Synovial-T-Zellen (Seitz et al., 2006). Ebenso gewährleistet die Verwendung der COS-7-Zellen als APZ durch das große SV40 T-Antigen eine starke Proteinexpression aufgrund hoher Plasmidkopienzahl und dadurch eine adäquate Antigenpräsentation und nachfolgende Plasmidanalyse des präsentierten Peptids einzeln isolierter Zellen. Die stabile Transfektion der COS-7-Zellen mit pTM-HLA-B27 (COS-B27-Zellen) stellt eine weitestgehend gleich bleibende Expression von HLA-B27 sicher.

Dazu kommt, dass die Plasmid-kodierten kurzen Peptide nicht den komplexen proteasomalen Prozessierungsweg durchlaufen müssen bevor sie direkt auf HLA-I-Moleküle beladen werden. Im Gegensatz zu Vollen-Längen-cDNS-Bibliotheken, die von betroffenem Gewebe unter Erhalt des Leserasters gewonnen werden müssen (Wong et al., 1999), umgehen die kurzen Peptide den voneinander abweichendem Antigenprozessierungsweg in Zellen in vitro von dem in APZ, die an einer Inflammation beteiligt sind.

Die Methode ist sehr sensitiv, da unter Anwendung des NFAT-sGFP-Reportersystems die Aktivierung einer einzelnen T-Zelle im Umfeld von vielen nicht-aktivierten TZR aufdeckbar ist. Dies steht im Vergleich zur Aktivierungsmessung anhand der Durchflusszytometrie oder des IL2-ELISAs oder eines Zytotoxizitätsassays (mittels Chromfreisetzung). Mit Hilfe der Inspektion einer hohen Anzahl an APZ im Fluoreszenzmikroskop nach aktivierten grün leuchtenden TZR-Zellen ist eine schnelle Detektion von Antigenen möglich, denn die APZ kann direkt isoliert werden und das peptidkodierende Plasmid kann amplifiziert und analysiert werden. Zur Aufdeckung und Isolierung einzelner APZ ist keine große Affinität des TZR zum pMHC-Molekül erforderlich, da die T-Zellen durch Kokultivierung auf den antigenpräsentierenden pCOS-B27-Zellen liegen.

Diese Sensitivität macht jedoch auch den Umgang der TZR-Transfektanten sensibel, da durch äußere Einflüsse, wie zu dichte Zellzahl oder minimale Unterschiede in der Kultivierung, die TZR-Hybridome leicht aktivierbar sind. Durch Kalzium-Einstrom aufgrund von äußeren Einflüssen und zellulärem Stress kann es zu einer NFAT-Aktivierung kommen, was sich in einer falsch-positiven sGFP-Expression der TZR-Transfektanten äußert und eine Unterscheidung zur echt-positiven grünen Fluoreszenz, die durch eine Aktivierung aufgrund der TZR-Erkennung ausgelöst wurde, erschwert. Deshalb wurden nur Versuchsansätze ohne Hintergrund durch eine falsch-positive Aktivierung der TZR-Hybridomzellen ausgewertet. Überdies zeigte sich, dass nur eine Anhäufung mehrerer grün leuchtender T-Zellen signifikant eine positive APZ markiert. Bei geringer Affinität des TZR an pHLA-B27 können sich durch minimale Erschütterungen die T-Zellen von der APZ lösen. Dies führt nicht zur Isolation der APZ mit stimulierendem Plasmid. Auch ist das Wanderungsverhalten aktivierter T-Zellen nicht zu vernachlässigen, denn die Aktivierung ist nicht reversibel.

Trotz Achtsamkeit mit der Handhabung der TZR-Transfektanten, um so genannte Hintergrundaktivierungen auszuschließen und einer Isolation von APZ mit festem T-Zell-Kontakt, die durch mehrere aktivierte grün fluoreszierenden Zellen markiert waren, führten isolierte APZ pCOS-B27 aus den genannten Gründen nach Analyse der Plasmide auf Reaktivierung zu keinem positiven Peptid.

Der Schritt der Isolation der adhärennten pCOS-B27 selbst, bringt darüber hinaus auch die Notwendigkeit mit sich nicht korrekte Plasmide zu analysieren, da durch die Isolation mit der Glaskapillare oft mehr als eine Zelle entfernt wird und die einzelne APZ verschiedene Plasmide enthalten kann. Die Menge vieler zusätzlicher negativer Plasmide erschwert bei der nachfolgenden Analyse die Identifikation des positiven peptidkodierenden Plasmids. Das stimulierende Plasmid-kodierte Peptid anzureichern und heraus zu filtern ist aufwendig und bedarf vieler Reaktivierungsschritte und Bakteriensubpools, bis schließlich ein Einzelklon vorliegt. Denn durch die Transfektion mit Fugene werden bis zu 200 Plasmide pro Zelle transfiziert und die Plasmidanzahl pro Zelle steigt auf mehr als 5000 pro einzelner COS-7-Zelle an (siehe Abschnitt 6.4.4, S. 98; Siewert et al., 2012). Um die Analyse der isolierten Plasmide zu straffen, sollten zukünftig weniger unterschiedliche Plasmide in eine Zelle mit einer anderen Transfektionsmethode wie z.B. der Elektroporation transfiziert werden, wobei hier die Gefahr einer schlechteren Antigenexpression zu einer falsch-negativen TZR-Erkennung besteht. In dieser Arbeit zeigten nur fünf Plasmidpools von 24 gepickten pCOS-B27 eine Reaktivierung. Es ist zukünftig sinnvoll eine höhere Anzahl an positiven APZ zu isolieren, da eine Vielzahl nicht zum Ergebnis führt.

Bei der Verwendung von vier verschiedenen kombinatorischen Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken mit unterschiedlichen Peptidlängen, zeigte nur eine von fünf untersuchten TZR^{ReA}-Hybridomzellen, die TZR-Transfektante 1-V α 3-CD8-NFAT-sGFP mit dem TZR V α 3V β 1, eine signifikante TZR-Aktivierung und auch nachfolgende Reaktivierung bei der Bibliothek für Oktamere (siehe Abschnitt 6.4.3, Tabelle 4, S. 97).

Auch wenn die anderen vier TZR^{ReA}-Transfektanten nach der Inspektion mit keiner Bibliothek präsentierter Peptide stimuliert wurden, können diese trotzdem nicht als Antigenkandidaten ausgeschlossen werden. (Die Isolation von fünf pCOS-B27-Zellen der TZR^{ReA}-Transfektanten 2-V α 7, 4-V α 12 und 5-V α 23 zeigten keine Reaktivierung und wurden folgedessen als Hintergrundaktivierung gedeutet. Siehe Abschnitt 6.4.4, S. 98f). Repräsentativ

wäre das Ergebnis hingegen nur bei einer ausreichenden Anzahl gescannter antigenpräsentierender Zellen. Schließlich wurden nicht alle möglichen Peptidvariationen auf TZR-Erkennung inspiziert und die Komplexität jeder Bibliothek wurde aufgrund der Fülle der verschiedenen Versuchsansätze nicht hinreichend ausgenutzt. Für jede der vier Peptidbibliotheken wurde die Anzahl von mindestens $2,4 \times 10^6$ pCOS-B27 angeschaut, wobei die Komplexität der Peptidbibliotheken durch die effektiv generierte Klonzahl von 28×10^6 bis 278×10^6 maximal möglich bestimmt wird. Zwar verringert sich die Anzahl der tatsächlich präsentierten Peptide durch Plasmide mit nicht korrekt gebildeten Peptiden, durch Peptide mit generierten Stoppkodonen und durch die nicht vermeidbare Überexpression einiger Aminosäuren aufgrund des redundanten genetischen Codes. Eine nur etwa 50 %-ige Transfektionseffizienz von pcDNAlib in COS-B27-Zellen zeigt, dass die Anzahl der inspizierten APZ (COS-B27-Zellen) nicht auf die Anzahl präsentierter Peptide schließen lässt. Darüber hinaus reagieren nicht alle zugegebenen TZR^{ReA}-Transfektanten auf Stimulation mit sGFP-Fluoreszenz, was durch die Werte der Positivkontrolle bei einer starken Stimulation mit Antikörpern gegen den TZR gezeigt wurde. Die Aktivierung der TZR^{ReA}-Transfektanten resultiert in einer bis zu 80 %-igen sGFP-Expression (siehe Abbildung 16, S. 92). Zusammenfassend bedingen die genannten Gründe wiederum die Antigensuche mit einer größeren Anzahl von COS-B27-Zellen mit Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken.

Die Ergebnisse zeigen, dass der TZR^{ReA}-Kandidat 1-V α 3V β 1 ein Rezeptor sein kann, der von HLA-B27-restringierten Oktamerpeptiden stimuliert wird, da bereits nach anfänglicher Antigensuche mehrere Ansammlungen an aktivierten TZR-Hybridomzellen gefunden wurden. Deshalb wurde mit diesem TZR in Oktamerbibliotheken nach stimulierenden Mimotopen gesucht und positiv markierte Plasmide isoliert und analysiert. Es konnten 19 antigenpräsentierende pCOS-B27-Zellen, die durch aktivierte 1-V α 3V β 1-TZR-Zellen markiert waren, isoliert und ihre peptidkodierenden Plasmide analysiert werden. Davon zeigten fünf Plasmidpools nach einer Subklonierung eine Reaktivierung der 1-V α 3V β 1-TZR-Zellen. Schließlich konnten vier unterschiedliche Mimotope identifiziert werden, die für ein T-Zell-Epitop in Frage kommen. Im Hinblick auf das Gesamtergebnis der identifizierten Mimotope kann festgestellt werden, dass dieser TZR vermutlich eine Polyspezifität hat und auf sehr unterschiedliche oktamere Peptide reagieren kann (Besprechung siehe Abschnitt 7.2.3, S. 118). Die Analyse der positiven Plasmide deckte jedoch auch Besonderheiten von Plasmiden auf, die zu einer Stimulation des TZR^{ReA} 1-V α 3V β 1 führten, welche im nächsten Abschnitt 7.2.2 diskutiert werden.

7.2.2 Analyse der unterschiedlichen TZR stimulierenden Plasmide

Die erhaltenen Plasmidsequenzen lassen sich in drei Gruppen unterteilen: (1) Vier Plasmide mit korrekter oktamerkodierender Insertion, (2) Plasmide mit Stoppkodon-enthaltenden Insertionen kodierend für verkürzte Peptide mit einer Länge von zwei bis fünf Aminosäuren oder ein Plasmid ohne kodierende Peptidinsertion sowie (3) Vektoren mit internen Deletionen mit einer Größe von 2,8 kb statt 5,5 kb (siehe Abschnitt 6.4.5, S. 102ff, Tabelle 5).

Es wurden vier unterschiedliche Peptide identifiziert, die die TZR-Transfektante V α 3V β 1 stimulierten. Auffällig ist, dass aus einer initial isolierten pHLA-B27 APZ (Nr. 9.1.3) drei verschiedene Plasmid-kodierte Peptide isoliert wurden. Die Sequenzen der Mimotope werden im nächsten Abschnitt 7.2.3 diskutiert.

Der Befund, dass eine positive Aktivierung bei Plasmiden erfolgte, die nach Sequenzierung keine oktamerkodierende Insertion bzw. Deletionen des Subklonierungsvektors pcDNA3.1-TOPO offenbarten, war unerwartet. Alle positiven Plasmide von Einzelklonen wurden mehrmals getestet und zeigten eine erneute Aktivierung der TZR-Transfektanten.

Dies warf die Frage auf, ob eine Gemeinsamkeit in den verschiedenen vorliegenden Plasmiden zu finden ist, die zu einer TZR-Stimulierung führte. Falsch positive Ergebnisse sollten ausschließbar sein. Der Nachweis der Positivität der Einzelklone erfolgte über mehrere Reaktivierungsschritte mit jeweils einer Unterteilung in 30 Subpools, bei denen der Großteil der untersuchten Plasmid-DNS von bis zu 29 Transfektionsansätzen negativ war und keine TZR-Aktivierung zeigte. Nur einer dieser 30 unabhängigen Ansätze wurde aufgrund eines eindeutig positiven TZR-Stimulus weitergeführt und erneut weiter unterteilt. Deshalb wurde analysiert, ob alternativ kodierende Peptidsequenzen strangabwärts des CMV-Promotors liegen, die eine Expression eines stimulierenden Peptids erlauben. Alternative offene Leserahmen der verschiedenen Vektorbegebenheiten wurden ausgewertet. Die drei Möglichkeiten potentiell stimulierender Peptide der „aberranten“ Plasmide in pcDNA3.1-TOPO werden in der Abbildung 22 schematisch dargestellt.

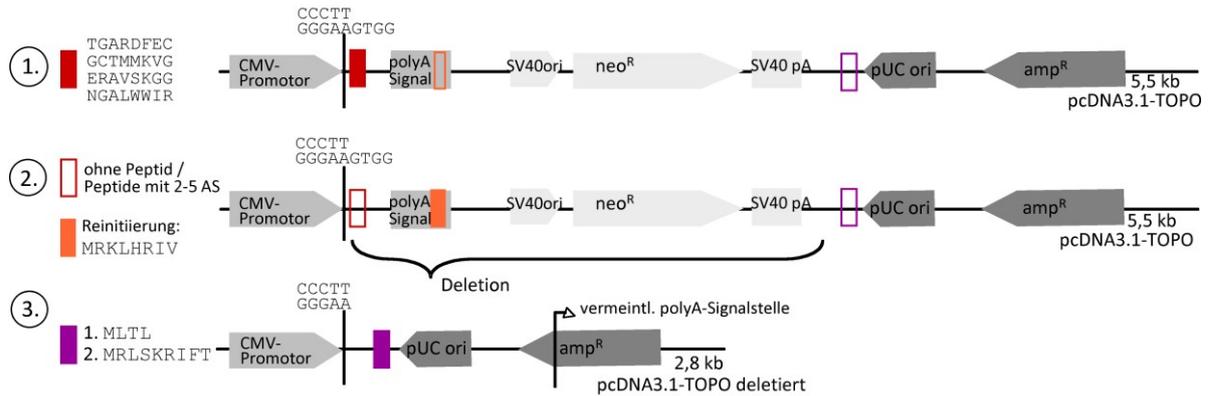


Abbildung 22: Peptidkandidaten der isolierten Einzelplasmide für die Aktivierung des TZR^{ReA}-Kandidaten Vα3Vβ1

Die Plasmide des Subklonierungsvektors pcDNA3.1-TOPO sind in drei Gruppen unterteilt und es sind Möglichkeiten schematisch gezeigt, wie jeweils ein exprimiertes Peptid eine Aktivierung der TZR Vα3Vβ1-Transfektanten induziert haben könnte. Die Vektorkarten sind hier vereinfacht linearisiert abgebildet. Die ausgefüllten farbigen Kästchen markieren die kodierende Peptidsequenz, wohingegen die unausgefüllten Kästchen die alternativen offenen Leserahmen markieren. Die überhängende Sequenz GTGG am Gegenstrang nach dem CMV-Promotor signalisiert die Stelle der Einklonierung des Amplifikats der peptidkodierenden Insertion mit 5'-CACC durch die Topoisomerase.

Wenn eine korrekte Insertion vorliegt, führt es entweder (1) zur Expression eines Oktamers (rot), oder (2) sehr kurze Peptide von 2 - 5 AS veranlassen das Ribosom zur Reinitiiierung der Translation eines Oktamers am Ende des Transkripts (orange). Die Selektion eines deletierten Vektors von 2,8 kb (3) könnte durch die Generierung eines Nonamers (violett) forciert sein. Genauere Besprechungen der verschiedenen Möglichkeiten sind im Text ausgeführt.

- ① Die erwartete Situation mit korrekter Insertion in pcDNA3.1-TOPO, deren Sequenz ein oktameres Peptid kodiert, konnte in vier verschiedenen Einzelklonen identifiziert werden. Die Aminosäuresequenzen der positiven Peptide unterscheiden sich zwar untereinander, könnten jedoch als funktionelle Antigene durch eine Präsentation auf HLA-B27 die TZR-Erkennung induzieren. Sie werden als vier potentielle TZR-Vα3Vβ1 Mimotope definiert (rotes Kästchen in Abbildung 22).
- ② Es wurden vier Plasmide analysiert, deren Insertion ein Stopp-Kodon enthalten, das zur Expression eines verkürzten Peptids führen würde. Es ist unwahrscheinlich, dass diese 2 - 5 Aminosäure langen Peptide auf HLA-B27 beladen werden und folglich eine TZR-Stimulierung bewirken. Eine ähnliche Situation tritt beim „leeren“ Vektor pcDNA3.1-TOPO auf (Nr. 8.3.2.4.1.4, Tabelle 5, S. 102). Bei diesen Plasmiden befindet sich 270 bp bzw. 423 bp (mit Insertion) strangabwärts der Einklonierungsstelle (Pos. 934) bei Position 1204 am Polyadenylierungssignal (1998-AATAAATG-1206) ein weiteres Translationsstartkodon ATG, welches noch im Transkript enthalten sein sollte, nachdem die Abspaltung des neusynthetisierten Transkripts 10 bis 30 Nukleotide nach dem Polyadenylierungssignal stattfindet und die Poly(A)-Polymerase an den transkribierten Strang nach der endonukleolytischen Spaltung der prä-mRNS an der Polyadenylierungsstelle etwa 250 Adenine anhängt (Proudfoot, 2011; Chen et al., 1995). Dieser alternative offene Leserahmen kodiert ein Peptid mit einer Länge von acht Aminosäuren MRKLHRIV (orangenes Kästchen in Abbildung 22), wenn das Startmethionin nicht abgespalten wird. Dieses Peptid besitzt auch den HLA-B27-spezifischen Anker Arginin an Position 2. Es ist möglich, dass die ribosomale Translationsmaschinerie nicht vom

Transkript nach dem ersten AUG dissoziiert, sondern die mRNA weiter absucht (Reinitiation). Viele Transkripte besitzen so genannte uORF (*upstream open reading frames*), die u.a. die Translation des eigentlichen ORF regulieren können (Kozak, 1987b; Kozak, 2001; Skabkin et al., 2013).

- ③ Darüber hinaus konnten neun Plasmide identifiziert werden, die eine TZR-Aktivierung induzierten, obwohl verkürzte Vektoren pcDNA3.1-TOPO aufgedeckt werden konnten. Die Deletionen traten an unterschiedlichen Nukleotidpositionen innerhalb 150 Nukleotiden auf, führten jedoch alle zur Entfernung des Bereichs zwischen Position 934 und 3451 (ab der Einklonierungsstelle bis zur Sequenz des Bakterien-Replikationsursprungs (pUCori)). Das einzelsträngige überhängende Ende GTGG am Gegenstrang, das gewöhnlich nötig ist für die Einklonierung von PCR-Produkten mit komplementären 5' Ende CACC, ist in den Plasmiden nicht mehr vorhanden. Durch die Nähe zum starken CMV-Promotor könnte nun ein Transkript eines alternativen offenen Leserahmens generiert werden, das an einem Polyadenylierungssignal AATAAA (Pos. 4701 - 4706 der pcDNA3.1-TOPO-Sequenz) terminiert würde und das potentiell zu einem stimulierenden Peptid führt (violettes Kästchen in Abbildung 22).

Dafür in Frage kommen würde ein nachfolgender offener Leserahmen für das Peptid MRLSKRIFT (Pos. 4419 - 4449 in korrektem pcDNA3.1-TOPO), das in allen neun positiven verkürzten Vektoren entstehen könnte. Weiterhin würden alle trunkierten Plasmide den uORF MLTL kodieren. Die generierte mRNA bei Plasmiden mit der kürzesten Deletion (ab Pos. 3451 und 3487) weist einen weiteren ersten ORF mit 22 Aminosäuren auf. Die Translationsstartstellen beider uORF weisen eine schwache Kozak-Sequenz auf (Kozak, 1989). Der dritte alternative offene Leserahmen für das genannte Peptid MRLSKRIFT besitzt eine starke Kozak-Sequenz mit Guanin an Nukleotidposition -3. (Plasmide mit längerer Deletion (ab Pos. 3581 und 3607) haben zwei ORF für MLTL und MRLSKRIFT).

Für einen Auslöser der TZR-Aktivierung durch das potentiell exprimierte Peptid MRLSKRIFT spräche weiterhin die spezifische Ankerposition von Arginin an Position 2 (R2) des HLA-B27-Bindemotivs, falls das Methionin des generierten Peptids nicht abgespalten werden würde. Die N-terminale Methioninabspaltung korreliert mit der N-End-Regel, die eine Halbwertszeit von Peptiden definiert, und ist abhängig von der zweiten Aminosäure (P2) (Bachmair et al., 1986). Eine Methioninabspaltung erfolgt immer dann, wenn kleine Aminosäurereste wie Glycin oder Serin folgen (Hirel et al., 1989). Bei einer großen Aminosäure wie Arginin bleibt Methionin bestehen (Wiltschi et al., 2009).

Ein weitere Auffälligkeit, die die Hypothese unterstützen könnte, dass ein unbeabsichtigt generiertes Peptid MRLSKRIFT eine TZR-Stimulierung bewirken könnte, sind die ähnlichen Aminosäuren zum potentiell generierten Peptid MRKLHRIV von Fall 2. Vier identische Aminosäuren an P1 (M), P2 (R), P6 (R) und an P7 (I) sowie an P5 und P8 die konservativen Austausch (K zu H und F zu V) zeigen eine homologe Peptidsequenz auf, auch wenn die Peptidlänge divergiert.

Die Betrachtung der Sequenzanalyse aller positiven Plasmide zeigt zusammenfassend unterschiedliche Situationen auf, wie es zu einer TZR-Stimulation gekommen sein könnte: Entweder wird ein stark stimulierendes korrektes Peptid exprimiert, wie es die gefundenen oktameren TZR-Epitope darstellen, oder Vektorbesonderheiten erlauben eine Expression von potentiellen HLA-B27-Liganden, was eine Selektion dieser Plasmide forcierte.

Der Ursprung der verkürzten pcDNA3.1-TOPO-Vektoren bleibt unklar. Eine Erklärung wäre zunächst, dass fehlerhafte Vektoren in dem gelieferten Klonierungsvektor vorhanden waren, die durch die nachfolgenden Reaktivierungsschritte angereichert wurden, da das vom Vektor kodierte alternativ exprimierte Peptid trotz Deletion des SV40ori zu einer starken TZR-Aktivierung führte. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sie nachträglich in Bakterien-subpools entstanden sind.

Festzustellen ist, dass der Subklonierungsvektor pcDNA3.1-TOPO für weitere Versuche in Zusammenhang mit HLA-B27 nicht geeignet erscheint, obwohl es in der kooperierenden Arbeitsgruppe erfolgreich für andere HLA-Allele war (K. Dornmair, persönliche Mitteilung). Vielmehr erscheint es für folgende Versuche sinnvoll, dass die Analyse des kodierten Peptids aus pcDNA-lib von pCOS-B27 mit Hilfe einer Klonierung des amplifizierten kodierten Peptidbereichs in pcDNA-spacer erfolgt wie in der Originalpublikation (Siewert et al., 2012). Denkbar wäre auch eine direkte Transformation des primären Plasmidpools in Bakterien.

Zusammenfassend wurden einige Peptidkandidaten für den potentiell pathologischen TZR $V\alpha 3V\beta 1$ identifiziert, die in weiteren Untersuchungen als stimulierender Ligand verifiziert werden müssen. Denkbar wäre z.B. eine Analyse einer effektiven HLA-B27-Beladung mit anschließender TRZ-Aktivierung durch exogene Zugabe von synthetischen Peptiden oder die Expression der spezifischen Peptide durch Klonierung der Sequenz in einen anderen Expressionsvektor.

Abschließend konnte das Auftreten der besonderen Gegebenheiten der stimulierenden Plasmide nicht geklärt werden. Jedoch erschienen die vier korrekten Peptide auf potentielle TZR- $V\alpha 3V\beta 1$ Mimotope hinzudeuten und wurden dementsprechend zur Identifizierung eines natürlichen HLA-B27-Liganden charakterisiert.

7.2.3 Charakterisierung der identifizierten TZR^{ReA} Mimotope

Der TZR^{ReA}-Kandidat 1- $V\alpha 3V\beta 1$ wird von vier Plasmid-kodierten Peptiden stimuliert, und ihre Aminosäuren sind TGARDFEC (Nr. 8.3.2-1), GCTMMKVG (Nr. 9.1.3-1), ERAVSKGG (Nr. 9.1.3-2) und NGALWWIR (Nr. 9.1.3-3) (siehe Abbildung 21, S. 104). Dabei entstammen diese Oktamerpeptide ursprünglich zwei verschiedenen isolierten pCOS-B27-Zellen (Zelle Nr. 8.3.2 und Nr. 9.1.3). Warum drei voneinander abweichende Peptidsequenzen nach der Analyse der Plasmide einer einzelnen isolierten APZ gefunden wurden, kann nur vermutet werden. Annehmbar ist, dass die drei verschiedenen Peptide auf der COS-B27 präsentiert wurden und gemeinsam zur Stimulation des TZR führten.

Als Mimotop werden TZR-Epitope definiert, die strukturell ähnlich sind, nur in einigen Aminosäuren voneinander abweichen und gleich wie das natürlich vorkommende Antigen

eine Stimulation des TZR induzieren können. Da die hier identifizierten stimulierenden T-Zell-Epitope nicht in ihrer Sequenz übereinstimmen, muss man davon ausgehen, dass der TZR^{ReA} 1-Vα3Vβ1 aufgrund der Polyspezifität in der Lage ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Antigenpeptiden zu erkennen. Eine kürzlich erschienene Arbeit in Bezug zu kreuzreaktiven, polyspezifischen T-Zellen zeigt einen einzelnen autoimmunen CD8⁺ T-Zell-Klon bei Typ I Diabetes im Kontext eines einzigen MHC-I-Moleküls, der bis zu eine Million völlig verschiedene Peptide erkennen kann (Wooldridge et al., 2012). Des Weiteren kristallisierte sich heraus, dass vor allem die Peptidlänge entscheidend für die Erkennung durch einen individuellen TZR ist (Ekeruche-Makinde et al., 2013). Das bedeutet, dass ein TZR spezifisch für ein Peptidrepertoire gleicher Länge ist. Demzufolge gilt es eine so genannte TZR Peptiderkennungssignatur zu bestimmen, welche die Aspekte der Peptidlängenpräferenz, der Anzahl erkannter Peptide und ihrer Sequenzidentität (abstammend von selbst oder pathogen) berücksichtigt, um effektiv eine T-Zell-vermittelte (Auto-)Immunität aufklären zu können (Wooldridge, 2013).

Letztendlich kann die Aufklärung einer Immunrelevanz der gefundenen T-Zell-Mimotope ohne experimentelle Evidenzen nicht erfolgen. Jedoch können die stimulierenden Peptide Hinweise auf natürlich vorkommende HLA-B27-restringierte T-Zell-Epitope liefern. Will man Peptide potentiell als pathogen oder arthritogen einstufen oder sie überhaupt als T-Zell-Epitop deklarieren, müssen folgende Betrachtungsweisen berücksichtigt werden (Ben Dror et al., 2010; zusammengefasst nach López de Castro 2010): (1) werden die Peptide an HLA-B27 stabil gebunden und demzufolge effektiv T-Zellen präsentiert aufgrund ihrer Länge, Eigenschaften und spezifischen Ankerpositionen, wobei hier auch unterschiedliche Konformationen der Bindungen an den HLA-B27 Subtypen einzubeziehen wären (Hülsmeier et al., 2004); (2) kommen sie als endogener prozessierter Ligand auch in vivo vor, denn die Antigenprozessierung schränkt das natürliche Vorkommen beträchtlich ein (Paradela et al., 2000); (3) von welchem Protein könnten die Peptide abgeleitet werden, wobei gewebe-spezifische Proteine vorzuziehen wären, die das Ziel eines autoimmunen Angriffs wären; (4) weisen die Peptide Ähnlichkeiten zwischen Selbst und mikrobiellen Epitopen auf.

Diesbezüglich wurden die in dieser Arbeit identifizierten T-Zell-Mimotope analysiert: Das HLA-B27-Bindemotiv und die Länge der gebundenen Peptide wurde durch Untersuchungen an einer größeren Zahl an natürlichen HLA-B27-Liganden sowohl von lymphoiden Zellen als auch von gelenkspezifischen Chondrozyten mittels Massenspektrometrie verfeinert und zeigt nicht mehr ganz so strikte HLA-B27-Anker auf wie früher angenommen (Jardetzky et al., 1991; López de Castro et al., 2004; MHC-Liganden Daten-bank www.syfpeithi.de; Ben Dror et al., 2010). Als Ankerpositionen wurde überwiegend Arginin an Position 2 (P2 ist R2) der HLA-B27-gebundenen Peptide gefunden, an P1 sind vor allem kleine Aminosäuren vertreten und in der Mitte des Peptids an P4 interagieren hauptsächlich negative Aminosäuren mit den positiven Resten der Bindungsfurche. Das typische Bindemotiv R2 kann nur bei dem Peptid kodiert von Klon 9.1.3-2, ERAVSKGG, festgestellt werden. Peptide mit Abweichungen vom HLA-B27-Bindemotiv sind jedoch nicht als potentielle arthritogene Kandidaten ausgeschlossen (Infantes et al., 2013). In der Studie wurde Glutamin an P2 nur in 3 % HLA-B27-Liganden gefunden. Dies legt eine mögliche Relevanz von Peptiden mit anderen Ankerpunkten wie R2 für SpA-assoziierte arthritogene Peptide offen.

Durch Herstellung einer HLA-B27 spezifischen Plasmid-kodierten Peptidbibliothek, die für Nonamerpeptide mit der Ankerposition R2 kodierten, sollte die Präsentation der Peptide mit einer optimalen HLA-B27-Beladung verbessert werden (Masterarbeit von Charlotte Flynn, 2013). Es wurde für keine der fünf TZR^{ReA}-Kandidaten eine Stimulation beobachtet, was auf die geringe Komplexität dieser Peptidbibliothek mit einer Gesamtklonzahl von $5,31 \times 10^6$ zurückgeführt werden kann. Eine Suche in einem größeren Maße, in Peptidbibliotheken höherer Komplexität und unter Einbezug von anderen Peptidlängenpräferenzen der TZR und weiteren Ankerpunkten wie Glutamin wäre vonnöten.

Zu berücksichtigen ist bei der Betrachtung der identifizierten Peptide stets, dass bei der Expression von Plasmid-kodierten Peptiden die Faktoren der Methionin-Abspaltung des translatierten Peptids (abhängig von der Größe der nachfolgenden Aminosäure, siehe oben; Wiltshi et al., 2009) und der N-terminalen Peptidkürzung durch die ERAP1-Peptidase während der Beladung auf HLA-B27 eine Rolle spielen. Tatsächlich an HLA-B27 gebundene Peptide können deshalb von ihrer Länge der analysierten Aminosäuresequenz abweichen. Betrachtet man diesbezüglich publizierte Peptide, denen experimentell eine Präsentation von HLA-B27 nachgewiesen wurde, muss angemerkt werden, dass einige dieser Peptide vermutlich in dem hier verwendeten Peptidbibliothek-Ansatz gar nicht gebildet werden würden. Demzufolge könnten solche Peptide als Antigenkandidaten einer optimalen Beladung auf HLA-B27 und TZR-Erkennung entgehen. Als Beispiel seien die für molekulare Mimikry bekannten humanen Peptide des VPR1 (412-RRRWHRWRL-420) und des Glucagon-Rezeptors (pGR: 236-RRRWRLTV-244) im Vergleich zum EBV-gewonnenen Peptid (pLMP2: 400-RRRKWRRHL-408) genannt. Denn drei große Argininreste sollten eine Methioninabspaltung verhindern (Wiltshi et al., 2009).

Möglicherweise erkennt der TZR^{ReA} V α 3V β 1 sowohl Oktamer- als auch Nonamerpeptide, je nachdem, ob Methionin entfernt wird oder nicht. Auch wenn vor allem die Peptidlänge entscheidend bei der Erkennung kreuzreaktiver TZR ist (Wooldridge, 2013), wurden immundominante TZR beschrieben, die Epitope unterschiedlicher Peptidlängen erkennen, jedoch in verschiedenstarker Immunogenität und Effektivität, was bei der Optimierung der T-Zell-Antwort bei der Peptidvakzinierung gegen Tumorantigene aufgedeckt wurde (Ekeruche-Makinde et al., 2012).

Schließlich wurden die identifizierten T-Zell-Mimotope eingehender betrachtet, um sich der Fragestellung nach möglicherweise arthritogenen Peptiden anzunähern. Mit Hilfe einer Datenbanksuche erlauben homologe Sequenzen in Proteinen im humanem oder in humanpathogenen Organismen Rückschlüsse auf natürlich vorkommende Peptide. Vor dem Hintergrund der Molekularen Mimikry Theorie sind dabei gewebespezifische Zielautoantigene als auch bakterielle Peptide von besonderem Interesse, die eine Kreuzreaktion hervorrufen könnten.

Deshalb wurde beim Peptidvergleich in veröffentlichten Proteinsequenzen (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) zuerst ohne Einschränkung der Taxa übereinstimmende Aminosäuren in Proteomen aller möglicher humanpathogener Bakterien ermittelt, die eine Kreuzreaktion hervorrufen könnten.

Zweitens wurde speziell das Proteom von *Shigella sonnei* durchsucht, da die Patientin, von der die SFMC gewonnen und daraus die TZR^{ReA}-Kandidaten isoliert wurden, nachweislich eine Infektion mit diesem Bakterium hatte, bevor sie an Reaktiver Arthritis erkrankte.

Drittens wurden homologe Peptidsequenzen in Proteinen in der humanen Proteindatenbank untersucht. Die Tabelle 6 der nachfolgenden Seite listet alle homologen Peptidsequenzen der genannten Spezies der vier identifizierten T-Zell-Mimotope auf. Als Kriterium starker Relevanz wurden alle Peptide erfasst, die mindestens in fünf von acht Aminosäuren übereinstimmen.

Die Höhe der Sequenzhomologie, die eine TZR-Erkennung antigenischer Mimikry benötigt, steht nicht fest und schon wenige Aminosäureaustausche können Kreuzreaktivität auslösen (López de Castro, 2010). In der Literatur finden sich hohe Übereinstimmung an homologen Sequenzen zwischen chlamydiellen und humanen Peptiden sowie zwischen einem aus HLA-B27-gewonnenen Peptid und Bakterienpeptiden, die als hypothetische kreuzreaktive Auslöser genannt werden (Ramos et al., 2002a; Cragnolini et al., 2009; Ben Dror et al., 2010; Alvarez-Navarro et al., 2013). Es fehlen - wie bereits oben dargestellt (siehe S. 110f) - Beispiele an nachweislich kreuzreaktiven T-Zellen durch Mimikry-Antigene bei der SpA. HLA-B27-restringierte kreuzreaktive T-Zellen wurden nur bei einem viralen Epitop gesehen (Fiorillo et al., 2000).

Tabelle 6: Vergleich der identifizierten Mimotope mit Peptiden unterschiedlicher Spezies

Die vier identifizierten TZR-Mimotope wurden mit Peptiden (NCBI-Proteinblast) verschiedener Spezies verglichen. Dabei wurden in einer allgemeinen Suche nur Übereinstimmungen von Proteinen von humanpathogenen Bakterien erfasst sowie spezifische Suchen nach Peptiden von *Shigella sonnei* und in humanen Proteinen durchgeführt. Untereinander sind alle angeführt, die mindestens in fünf AS eine Homologie aufweisen (homologe AS sind jeweils grau markiert im Vergleich zum darüber gelisteten Mimotop). Unterstrichene Proteinamen deuten auf mögliche relevante Zielautoantigene hin. Die Zugriffsnummern beziehen sich auf die NCBI/protein Datenbank.

Spezies	Aminosäuresequenz mit markierten Homologien	Proteinname, Funktion und Lokalisation	Protein Zugriffsnummer
	TGARDFEC	Mimotop Nr. 8.3.2-1	
	<i>Pseudomonas sp.; Pseudomonas luteola</i>		
	96 EVARDFEC 103	hypothetisches Protein	WP_010799203
	96 EVARDYEC 103		WP_019364135
	<i>Mycobacterium avium</i>		
	361 TGARDFEG 369	Acyl-CoA Synthetase	WP_019734880
	<i>Streptomyces sp.</i>		
	2 TGARDFEG 9	Dehydrogenase	YP_007858445
<i>Shigella sonnei</i>	53 TGARLFER 60	LysR Substratbindeprotein transkript. Regulator	YP_005456555
	115 TGHRDIEK 122	HycC, NADH-Ubichinon/Plastochinon	AAP32941
	235 TGATDFTR 242	Lytische Murein Transglykosylase	YP_313245
	174 ALARLFEC 181	Fimbriales Protein	WP_005153199
<i>Homo sapiens</i>	263 TGARPYEC 270	Zinkfingerprotein interagiert mit K Protein 1	AAI03960
	473 TGERNYEC 480	Zinkfingerprotein 90	AAH57245
	214 LLARDFEK 221	<u>Osteonectin, (SPARC)</u>	AAA60993
	96 CARDFESR 103	Immunglobulin schwere Kette variable Region	ACL36968
	146 LEARDFEG 153	NFκ-B Transkriptionsinhibitor delta	NP_640332
	13 LLARDFEL 20	ARAP1 Protein, involviert in Apoptose	AAH08315
	579 ALARDFER 586	MASL1, Onkogen, interagiert im Zellzyklus	BAA74737

Spezies	Aminosäuresequenz mit markierten Homologien	Proteinname, Funktion und Lokalisation	Protein Zugriffsnummer
GCTMMKVG Mimotop Nr. 9.1.3-1			
<i>Campylobacter concisus</i> (Zusammenhang mit Morbus Crohn)	250 KCTMMKVS 257	Isocitrat Dehydrogenase (NADP),	WP_021093172
<i>Campylobacter jejuni</i> (Auslöser Reaktiven Arthritis); <i>C. upsaliensis</i> , <i>C. coli</i> , <i>Heliobacter fennelliae</i>	1112 GCTMMRVC 1119	Glutamat Synthase	WP_019108967
<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	168 GSTMMKVG 175	DUF803 Magnesiumtransporter	EPR61010
<i>Shigella sonnei</i>	43 KSTMMKVL 50	D-Ribosetransporter ATP-Bindung	YP_312689
<i>Homo sapiens</i>	63 TVTMMKVL 70	Alternativ <u>LAMA1</u> , (Laminin) Glykoprotein an extrazellulärer Matrix, an Zelladhäsion beteiligt	CCQ43326
	2334 AITMMKVY 2341	Myc Bindepr. 2, MYCBP2, Ubiquitinproteinligase	EAW80567
	20128 ARTMMKVM 20135	<u>Titin</u> , Muskelsp. Protein, Sarkomer Bestandteil; Autoantikörper bei Sklerodermie (Kollagenose)	CAA62188
	77 YETMMRVG 84	<u>REEP2</u> Protein, Rezeptor Enhancer, Membran	AF251041_1
	1 ---MMKVG 5	<u>TBRG4</u> , TGF β Regulator 4, Zellzyklus, stimuliert die Kollagensynthese	AAB69312
ERAVSKGG Mimotop Nr. 9.1.3-2			
<i>Campylobacter concisus</i> , <i>Campylobacter sp.</i>	250 ERAASKGG 257	Peptidase M23	WP_004317230
<i>Shigella sonnei</i>	272 ERAVSVLG 279	Glutamat Transportprotein	YP_312531
	135 ADAVSKGN 142	LysR transkriptioneller Regulator CysB	YP_310775
	863 EMAVSKDA 870	SogL Protein	YP_007749314
	80 ERALEKGI 87	50S ribosomales Protein L18	YP_312242
	128 ARMVSKGR 135	Glutathion Peroxidase	YP_310389
	33 EREVVKGA 40	Phagenschwanz Röhrenprotein	YP_005457602
	244 IRAVVKGA 251	Mannitol-1-Phosphat 5-Dehydrogenase	YP_312585
<i>Homo sapiens</i>	35 ERAVSKLQ 42	LIM Antigen-ähnliches Protein 3 im Zytoplasma	NP_277049
	82 ERALSKGL 89	Cullin 9, p53-assoziiertes zytoplasm. Protein	AAH28159
	2206 EPAVAKGG 2213	<u>Chondroitinsulfat Proteoglycan 4 (CSPG4)</u>	NP_001888
	303 ERAHSKGV 310	Smu-1, alternatives Spleißen von prä-mRNS	EAW58523
	138 ERAVSMHN 145	SH3BP5L SH3-Bindedomäne Protein 5-ähnlich	NP_085148
	105 ERAVSDRL 112	L-Myc Protein, Transkriptionsfaktor	AAA59878
	5 ERAVSMLE 12	<u>Plakophilin 2</u> , Cadherinverbindung Zytoskelett	EAW88516
	77 ERAVSDSF 84	Protein lifeguard 3 (TMBIM1), Transmembraner Inhibitor	AAH26693
	240 ERAVSPVA 247	Zinkfinger CCHC Domäne Protein 12	NP_776159
NGALWWIR Mimotop Nr. 9.1.3-3			
<i>Shigella flexneri</i>	81 NGALWWVQ 88	Pili-assoziiertes Adhäsionsprotein	WP_005130439
<i>Shigella sonnei</i>	206 SSALWWTR 213	Chemotaxis Protein	WP_000483237
	509 NGALWGGE 516	Transkriptioneller Regulator	YP_311695
<i>Homo sapiens</i>	290 NSSLWWII 297	<u>Vasoaktiven intestinalen Peptid-Rezeptor (VIPR1)</u> Neuropeptidrezeptor	AAH64424
	20 RGALWWVP 27	StART, Lipidtransfer Endosomenmembran	BAD93009
	193 PGALWWLL 200	TCEA2 Protein, Transkriptionselongation Nukleus	AAH50623
	64 HGALWWWY 71	CHRNA10, Neuronaler Acetylcholinrezeptor	AAI36251
	238 NDALWWQA 245	<u>MPP4</u> Membranprotein in Retina (Retinitis)	BAB69013

Die Untersuchung auf Sequenzhomologien der identifizierten Mimotope in verschiedenen Proteomen zeigt ähnliche Peptide mit einigen Aminosäureaustauschen auf. Bei der uneingeschränkten Datenbanksuche und anschließender Auflistung der homologen Proteine von humanpathogenen Bakterien treten vorrangig Bakterien hervor, die an der Entstehung von Reaktiver Arthritis beteiligt sind. Z.B. sei hier *Campylobacter jejuni* genannt, das als Infektionskeim vor einer ReA bekannt ist. Erwähnenswert ist auch das Auftreten von ähnlichen Peptiden in den Bakterienarten *Campylobacter concisus*, *Mycobacterium avium*, da hier ein Zusammenhang zur Autoimmunerkrankung Morbus Crohn besteht, die auch in Verbindung mit SpA auftritt (Chiodini et al., 1984; Zhang et al., 2009).

Interessant als Zielautoantigene erscheinen die Peptide mit übereinstimmenden Aminosäuren in humanen Proteinen, die speziell am Knochen-/Knorpelstoffwechsel beteiligt sind, und bestenfalls nicht ubiquitär im Körper exprimiert werden, sondern in Knochen oder Gelenken auftreten. Diese acht Peptide von 22 aufgeführten humanen Proteinen sind in der Tabelle 6 unterstrichen markiert und werden nachfolgend kurz vorgestellt.

Zu erwähnen wäre explizit die an der Kollagensynthese involvierten Proteine wie das Glykoprotein Osteonectin, das mit der extrazellulären Matrix und Kollagenen interagiert. Das Protein TBRG4 stimuliert die Kollagensynthese. Beachtenswert erscheinen auch Proteine, wie Laminin (LAMA1), das an Zelladhäsion beteiligt ist, Plakophilin 2, das Cadherine verbindet oder das Muskel-spezifische Protein Titin, gegen das Autoantikörper bei der Kollagenose Sklerodermie gefunden wurde. Im Zusammenhang mit autoimmunen Krankheiten fällt der membran-ständige Rezeptor-Enhancer REEP2 mit systemischen Lupus erythematosus auf.

Ein Peptid des vasoaktiven intestinalen Peptid-Rezeptors (VIPR1) teilt fünf Aminosäuren mit dem Mimotop NGALWWIR. Ein anderes Peptid dieses Rezeptors wird HLA-B27 restringiert erkannt und zeigt die mehrfach erwähnte molekulare Mimikry. Der Rezeptor wird auch im Muskel exprimiert, kann die IL2-vermittelte T-Zell-Proliferation hemmen und sein Beitrag wird in vielen Krankheiten erwogen u.a. in Morbus Crohn, in unterschiedlichen Formen von Arthritis, Multiple Sklerose oder Myasthenia gravis.

Das Membranprotein MPP4 (palmitoyliertes Membranprotein 4) in der Retina kann bei den aufgelisteten homologen Peptiden als einziges genannt werden, das spezifisch in nur einer Körperregion exprimiert wird und deshalb potentiell als Zielautoantigen von zytotoxischen T-Zellen in Frage kommt. Uveitis wird bei einer klinischen Untergruppe der ReA beobachtet (Selmi und Gershwin, 2014).

Anzuführen wäre noch ein Peptid von Chondroitinsulfat Proteoglycan 4 (CSPG4), das in sechs Aminosäuren mit dem Mimotop ERAVSKGG übereinstimmt. Das extrazelluläre Matrixprotein ist ein Immunmarker bei Melanom und wird auch in Zusammenhang einiger autoimmunen Krankheiten wie Multiple Sklerose oder Osteoarthritis untersucht. Funktionell ist es u.a. an der Migration der Endothelzellen, an der Angiogenese beteiligt, fungiert als Rezeptor von Kollagen (VI) und moduliert das Plasminogensystem. CSPG4 gehört der Gruppe der Knorpelstrukturproteine der Proteoglykane an wie auch das Protein Aggrecan (CSPG1), von dem ein Peptid als potentiell arthritogen in SpA postuliert wird.

Die dargestellten homologen Peptide, die sowohl aus bakteriellen, als auch aus humanen Proteinen stammen, könnten verwendet werden nachzuweisen, ob sie endogen prozessiert auf HLA-B27 präsentiert werden und ob sie direkt den TZR^{ReA}-Kandidaten Vα3Vβ1

aktivieren. Sie fungieren somit als wichtige Ansatzpunkte zur Bewertung der identifizierten ReA-Mimotope, um eine Charakterisierung zu natürlich vorkommenden kreuzreaktiven T-Zell-Epitope zu ermöglichen.

7.3 Ausblick

Kreuzreaktive zytotoxische T-Zellen, die ein HLA-B27-restringiertes arthritogenes Peptid mit Ähnlichkeiten zu einem bakteriellen Antigen erkennen und bei der Immunpathogenese der Reaktiven Arthritis durch Zerstörung der Zielzellen an einer Entzündung maßgeblich beteiligt sind, wurden noch nicht nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnten anhand von ins Gelenk infiltrierte CD8⁺ ZTL von ReA Patienten klonal expandierte TZR mit CDR3-Spektratypisierung analysiert werden. Die Anwesenheit klonaler T-Zellen mit spezifischen TZR weist auf ein arthritogenes Autoantigen hin, das Ziel des Angriffes von körpereigenen Zellen ist. Von diesen T-Zellen wurden fünf Kandidaten der α -Kette identifiziert, die mit der klontypisch bereits bekannten TZR β^{ReA} -Kette potentiell einen TZR ausbilden, der an der Entzündungsreaktion beteiligt sein könnte. Diese fünf TZR ReA -Kandidaten wurden auf der Oberfläche einer TZR-defizienten Maus-Hybridomzelllinie funktionell exprimiert und als Werkzeug verwendet zur Suche nach dem arthritogenen Peptid in Plasmid-kodierten Peptidbibliotheken mit vier unterschiedlichen Peptidlängen. Im Rahmen der unvollständigen Anzahl untersuchter Peptide, zeigte einer der fünf TZR ReA -Kandidaten eine Präferenz für Oktamerpeptide. Es konnten vier Oktamerpeptide identifiziert werden, die starke Homologien zu bakteriellen oder humanen Peptiden aufweisen.

Die Frage, ob diese Mimotope und ihre homologen Partner den TZR V α 3V β 1 aktivieren, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ebenso sollten auch Liganden für die vier weiteren TZR ReA -Kandidaten identifiziert und auf Kreuzreaktivität getestet werden. Hier ist besonders der TZR V α 25V β 1 interessant, der bei unterschiedlichen Patienten nachgewiesen wurde.

Unabdingbar ist auch eine Evidenz der Immunogenität der arthritogenen Peptidkandidaten bei T-Zellen weiterer Patienten. Nach Stimulation primärer T-Zellen aus Synovialflüssigkeiten mit synthetischen Peptiden auf HLA-B27 können Nachweise mit durchflusszytometrischer Messung intrazellulärer Zytokine oder mit Zytotoxizitätsassays gegen HLA-B27⁺ Zielzellen erfolgen.

Prinzipiell ist nicht davon auszugehen, dass ein einzelnes Autoantigen für die unterschiedlichen Krankheitserscheinungen der ReA verantwortlich ist. Zweifellos muss die Krankheitsentstehung von SpA als Zusammenspiel von adaptiven und angeborenen Immunfaktoren angesehen werden. Die Autoimmunreaktion wird sowohl von Entzündungen im Gelenk durch spezifische Zielantigene als auch von autoinflammatorischen Stimuli in den Knochen-/Gelenkregionen und im Intestinaltrakt hervorgerufen (Stoll, 2011).

Nichtsdestotrotz können die in dieser Arbeit identifizierten T-Zell-Rezeptoren und antigenen Peptide einen Beitrag zur Aufklärung kausativer Faktoren bei der Immunpathogenese der ReA und der SpA leisten. Langfristig wäre die Entwicklung einer spezifischen Immuntherapie erstrebenswert, wie eine Antigen-spezifische Induktion der Toleranz von autoimmunen T-Zellen. Anwendung einer oralen Toleranzinduktion mit HLA-B27-Peptiden fand in einer

klinischen Studie mit vorübergehender Verbesserung der Erkrankung in Patienten mit Uveitis statt (Thurau et al., 2004). In einer aktuellen klinischen Studie bei Multiple Sklerose Patienten wurde eine Abnahme der autoreaktiven T-Zellen nach einer Behandlung mit PBMC, die mit sieben bekannten Myelinpeptiden gekoppelt waren, beschrieben (Lutterotti et al., 2013). Diese ersten Erfolge in der spezifischen Therapie von Autoimmunerkrankungen machen den hier beschriebenen Ansatz der Suche nach HLA-B27 restringierten autoreaktiven T-Zell-Epitopen weiterhin bedeutsam.

8 Literaturverzeichnis

1. Allen, R.L., O'Callaghan, C.A., McMichael, A.J. and Bowness, P. (1999). Cutting Edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J. Immunol.* 162, 5045-5048.
2. Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J. Taccioli, G., and Chen, J. (1992). VDJ recombination. *Immunol. Today* 13, 306-314.
3. Alvarez-Navarro, C., Cragolini, J.J., Dos Santos, H.G., Barnea, E., Admon, A., Morreale, A. and López de Castro, J.A. (2013). Novel HLA-B27-restricted Epitopes from *Chlamydia trachomatis* Generated upon Endogenous Processing of Bacterial Proteins Suggest a Role of Molecular Mimicry in Reactive Arthritis. *J. Biol. Chem.* 288, 25810-25825.
4. Appel, H., Kuon, W., Kuhne, M., Wu, P., Kuhlmann, S., Kollnberger, S., Thiel, A., Bowness, P. and Sieper, J. (2004). Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in *Chlamydia*-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther.* 6, 521-534.
5. Appel, H., Sieper, J. und Rudwaleit, M. (2006). Molekulare Pathomechanismen von HLA-B27 und anderen Genen bei Spondyloarthritis. *Akt. Rheumatol.* 31, 24-32.
6. Archbold J.K., Macdonald W.A., Miles J.J., Brennan R.M., Kjer-Nielsen L., McCluskey J., Burrows S.R. and Rossjohn J. (2006). Alloreactivity between disparate cognate and allogeneic pMHC-I complexes is the result of highly focused, peptide-dependent structural mimicry. *J. Biol Chem.* 281, 34324-34332.
7. Arden, B, Clark, S.P., Kabelitz, D. and Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 455-500.
8. Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human $\alpha\beta$ T cell receptor diversity. *Science* 286, 958-961.
9. Atagunduz, P., Appel, H., Kuon, W., Wu, P., Thiel, A., Kloetzel, P.M. and Sieper, J. (2005). HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 52, 892-901.
10. Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassman, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroeder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R. and Rajewsky, K. (2000). Clonal expansions of CD8 (+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 192, 393-404.
11. Babbit, B.P., Allen, O.M., Matsueda, G., Haber, E. and Unanue, E.R. (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359-361.
12. Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.

13. Balomenos, D., Balderas, R.S., Mulvany, K.P., Kaye, J., Kono, D.H. and Theophilopoulos, A.N. (1995). Incomplete T cell receptor V β allelic exclusion and dual V β -expressing cells. *J. Immunol.* 155, 3308-3312.
14. Barber, D.F., Obeso, D., Carcia-Hoyo, R., Villadangos, J.A. and Lopéz de Castro, J.A. (1996). T-cell receptor usage in alloreactivity against HLA-B*2703 reveals significant conservation of the antigenic structure of B*2705. *Tissue Antigens* 47, 478-484.
U39096, U39127
15. Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F. and Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9-20.
16. Bas, S., Griffais, R., Kvien, T.K., Glennås, A., Melby, K. and Vischer, T.L. (1995). Amplification of plasmid and chromosome Chlamydia DNA in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated seronegative oligoarthropathies. *Arthritis Rheum.* 38, 1005-1013.
17. Ben Dror, L., Barnea, E., Beer, I., Mann, M. and Admon A. (2010). The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis Rheum.* 62, 420-429.
18. Benjamin, R. and Parham, P., (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* 11, 137-142.
19. Bird, L.A., Peh, C.A., Kollnberger, S., Elliot, T., McMichael, A.J. and Bowness, P. (2003). Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur. J. Immunol.* 33, 748-759.
20. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-518.
21. Blank, U., Boitel, B., Mége, D., Ermonval, M. and Acuto, O. (1993). Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. *Eur. J. Immunol.* 23, 3057-3065.
22. Bowness, P., Zaccai, N., Bird, L. and Jones, E.Y. (1999). HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Exp. Rev. Mol. Med.* 1, 1-10.
23. Bowness, P. (2002). HLA-B27 in health and disease: a double-edge sword? *Rheumatol.* 41, 857-868.
24. Boyle, L.H., Goodall, J.C., Opat. S.S. and Gaston, J.S. (2001). The recognition of HLA-B27 by human CD4(+) T lymphocytes. *J. Immunol.* 167, 2619-2624.
25. Braun, J., Bollow, M., Remlinger, G., Eggens, U., Rudwaleit, M., Distler, A. and Sieper, J. (1998). Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum.* 41, 58-67.
26. Brenner, M.B.; Mclean, J., Dialynas, P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidmann, J.G., Ip, S., Rosen, F. and Krangel, M.S. (1986). Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145-149.

27. Brewerton, D.A., Hart, F.D., Nicholls, A., Caffrey, M., James, D.C. and Sturrock, R.D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1, 904-907.
28. Brodsky, F. M., Bodmer, W.F. and Parham, P. (1979). Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 9, 536-45.
29. Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D.P., McCarthy, M.I., Ouwehand, W.H., Samani, N.J., Todd, J.A., Donnelly, P., Barrett, J.C., Davison, D., Easton, D., Evans, D.M., Leung, H.T., Marchini, J.L., Morris, A.P., Spencer, C.C., Tobin, M.D., Attwood, A.P., Boorman, J.P., Cant, B., Everson, U., Hussey, J.M., Jolley, J.D., Knight, A.S., Koch, K., Meech, E., Nutland, S., Prowse, C.V., Stevens, H.E., Taylor, N.C., Walters, G.R., Walker, N.M., Watkins, N.A., Winzer, T., Jones, R.W., McArdle, W.L., Ring, S.M., Strachan, D.P., Pembrey, M., Breen, G., St. Clair, D., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Jones, L., Fraser, C., Green, E.K., Grozeva, D., Hamshere, M.L., Holmans, P.A., Jones, I.R., Kirov, G., Moskvina, V., Nikolov, I., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Collier, D.A., Elkin, A., Farmer, A., Williamson, R., McGuffin, P., Young, A.H., Ferrier, I.N., Ball, S.G., Balmforth, A.J., Barrett, J.H., Bishop, T.D., Iles, M.M., Maqbool, A., Yuldasheva, N., Hall, A.S., Braund, P.S., Dixon, R.J., Mangino, M., Stevens, S., Thompson, J.R., Bredin, F., Tremelling, M., Parkes, M., Drummond, H., Lees, C.W., Nimmo, E.R., Satsangi, J., Fisher, S.A., Forbes, A., Lewis, C.M., Onnie, C.M., Prescott, N.J., Sanderson, J., Matthew, C.G., Barbour, J., Mohiuddin, M.K., Todhunter, C.E., Mansfield, J.C., Ahmad, T., Cummings, F.R., Jewell, D.P., Webster, J., Brown, M.J., Lathrop, M.G., Connell, J., Dominiczak, A., Marcano, C.A., Burke, B., Dobson, R., Gungadoo, J., Lee, K.L., Munroe, P.B., Newhouse, S.J., Onipinla, A., Wallace, C., Xue, M., Caulfield, M., Farrall, M., Barton, A.; Biologics in RA Genetics and Genomics Study Syndicate (BRAGGS) Steering Committee, Bruce, I.N., Donovan, H., Eyre, S., Gilbert, P.D., Hilder, S.L., Hinks, A.M., John, S.L., Potter, C., Silman, A.J., Symmons, D.P., Thomson, W., Worthington, J., Dunger, D.B., Widmer, B., Frayling, T.M., Freathy, R.M., Lango, H., Perry, J.R., Shields, B.M., Weedon, M.N., Hattersley, A.T., Hitman, G.A., Walker, M., Elliott, K.S., Groves, C.J., Lindgren, C.M., Rayner, N.W., Timpson, N.J., Zeggini, E., Newport, M., Sirugo, G., Lyons, E., Vannberg, F., Hill, A.V., Bradbury, L.A., Farrar, C., Pointon, J.J., Wordsworth, P., Brown, M.A., Franklyn, J.A., Heward, J.M., Simmonds, M.J., Gough, S.C., Seal, S.; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Stratton, M.R., Rahman, N., Ban, M., Goris, A., Sawcer, S.J., Compston, A., Conway, D., Jallow, M., Newport, M., Sirugo, G., Rockett, K.A., Bumpstead, S.J., Chaney, A., Downes, K., Ghorri, M.J., Gwilliam, R., Hunt, S.E., Inouye, M., Keniry, A., King, E., McGinnis, R., Potter, S., Ravindrarajah, R., Whittaker, P., Widdens, C., Withers, D., Cardin, N.J., Davison, D., Ferreira, T., Pereira-Gale, J., Hallgrimsdottir, I.B., Howie, B.N., Su, Z., Teo, Y.Y., Vukcevic, D., Bentley, D., Brown, M.A., Compston, A., Farrall, M., Hall, A.S., Hattersley, A.T., Hill, A.V., Parkes, M., Pembrey, M., Stratton, M.R., Mitchell, S.L., Newby, P.R., Brand, O.J., Carr-Smith, J., Pearce, S.H., McGinnis, R., Keniry, A., Deloukas, P., Reveille, J.D., Zhou, X., Sims, A.M., Dowling, A., Taylor, J., Doan, T., Davis, J.C., Savage, L.,

- Ward, M.M., Learch, T.L., Weisman, M.H., Brown, M.; Wellcome Trust Case Control Consortium; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC) (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.* 39, 1329-1337.
30. Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M.A. and Wucherpfennig, K.W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967-979.
 31. Chan, A.T., Kollnberger, S.D., Wedderburn L.R. and Bowness P. (2005). Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 3586–3595.
 32. Chen, F., MacDonald, C.C. and Wilusz, J. (1995). Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic. Acids Res.* 23, 2614–2620.
 33. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S. and Coutu, J.A. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 29, 1073-1079.
 34. Chothia, C., Boswell, D.R., and Lesk, A.M. (1988). The outline structure of the T-cell $\alpha\beta$ receptor. *EMBO J.* 7, 3745-3755.
 35. Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. and Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 629-662.
 36. Colbert, R.A., Tran, T.M. and Layh-Schmitt, G. (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol. Immunol.* 57, 44-51.
 37. Colmegna, I., Cuchacovich, R. and Espinoza, L.R. (2004). HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 348-369.
 38. Cragnolini, J.J., García-Medel, N. and de Castro, J.A. (2009). Endogenous processing and presentation of T-cell epitopes from *Chlamydia trachomatis* with relevance in HLA-B27-associated reactive arthritis. *Mol. Cell Proteomics* 8, 1850-1859.
 39. D'Amato, M., Fiorillo, M.T., Carcassi, C., Mathieu, A., Zuccarelli, A., Bitti, P.P., Tosi, R. and Sorrentino, R. (1995) Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur. J. Immunol.* 25, 3199–3201.
 40. Dangoria, N.S., DeLay, M.L., Kingsbury, D.J., Mear, J.P., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. and Colbert, R.A. (2002). HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 23459-23468.
 41. Dave, V.P., Larche, M., Rencher, S.D., Koop, B.F. and Hurwitz, J.L. (1993). Restricted usage of T-cell receptor V alpha sequence and variable-joining pairs after normal T-cell development and bone marrow transplantation. *Hum. Immunol.* 37, 178-184.
 42. Davis, M.M., and Bjorkmann, P.J. (1988). T cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.

43. Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. and Chien, Y-H. (1998). Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 523-544.
44. Dietrich, P.-Y., Le Gal, F.-A., Dutoit, V., Pittet, M., Trautman, L., Zippelius, A., Cognet, I., Widmer, V., Walker, P., Michielin, O., Guillaume, P., Connerotte, T., Jotereau, F., Coulie, P.G., Romero, P., Cerottini, J.-C., Bonneville, M. and Valmori, D. (2003). Prevalent role of TCR α -chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. *J. Immunol.* 170, 5103-5109.
45. Dong, L., Li, P., Oenema, T., McClurkan, C.L. and Koelle, D.M. (2010). Public TCR use by herpes simplex virus-2-specific human CD8 CTLs. *J. Immunol.* 184, 3063-3071.
46. Dornmair, K., Goebels, N., Weltzien, H-U., Wekerle, H. and Hohlfeld, R. (2003). T-cell-mediated autoimmunity. Novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *Amer. J. Pathol.* 163, 1215-1226.
47. Dougados, M. and Baeten, D. (2011). Spondyloarthritis. *Lancet* 377, 2127-2137.
48. Duchmann, R., Lambert, C., May, E., Höhler, T. and Märker-Hermann, E. (2001). CD4+ and CD8+ clonal T cell expansions indicate a role of antigens in ankylosing spondylitis; a study in HLA-B27+ monozygotic twins. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 315-22.
49. Dulphy, N., Peyrat, M.a., Tieng, V., Douay, C., Rabian, C., Tamouza, R., Laoussadi, S., Berenbaum, F., Chabot, A., Bonneville, M., Charron, D. and Toubert, A. (1999). Common intraarticular T cell expansions in patients with Reactive Arthritis: Identical β -chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J. Immunol.* 162, 3830-3839.
50. Dulphy, N., Rabain, R., Douay, C., Flinois, O., Laoussadi, S., Kuipers, J., Tamouza, R., Charron, D. and Toubert, A. (2002). Functional modulation of expanded CD8+ synovial fluid T cells by natural killer cell receptor expression in HLA-B27-associated reactive arthritis. *Int. Immunol.* 14, 471-479.
51. Ekeruche-Makinde, J., Clement, M., Cole, D.K., Edwards, E.S., Ladell, K., Miles, J.J., Matthews, K.K., Fuller, A., Lloyd, K.A., Madura, F., Dolton, G.M., Pentier, J., Lissina, A., Gostick, E., Baxter, T.K., Baker, B.M., Rizkallah, P.J., Price, D.A., Wooldridge, L. and Sewell, A.K. (2012). T-cell receptor-optimized peptide skewing of the T-cell repertoire can enhance antigen targeting. *J Biol. Chem.* 287, 37269–37281.
52. Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., Miles, K.M., Bulek, A.M., Clement, M., Williams, T., Trimby, A., Bailey, M., Rizkallah, P., Rossjohn, J., Peakman, M., Price, D.A., Burrows, S.R., Sewell, A.K. and Wooldridge, L. (2013). Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* 121, 1112–1123.
53. Ellis, S.A., Taylor, C., McMichael, A. (1982). Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* 5, 49-59.
54. Evans, D.M., Spencer, C.C., Pointon J.J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Oppermann, U., Diltthey, A., Pirinen, M., Stone, M.A., Appleton, L., Moutsianas, L.,

- Leslie, S., Wordsworth, T., Kenna, T.J., Karaderi, T., Thomas, G.P., Ward, M.M., Weisman, M.H., Farrar, C., Bradbury, L.A., Danoy, P., Inman, R.D., Maksymowych, W., Gladman, D., Rahman, P.; Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC), Morgan, A., Marzo-Ortega, H., Bowness, P., Gaffney, K., Gaston, J.S., Smith, M., Bruges-Armas J, Couto, A.R., Sorrentino, R., Paladini, F., Ferreira, M.A., Xu, H., Liu, Y., Jiang, L., Lopez-Larrea, C., Díaz-Peña, R., López-Vázquez, A., Zayats, T., Band, G., Bellenguez, C., Blackburn, H., Blackwell, J.M., Bramon, E., Bumpstead, S.J., Casas, J.P., Corvin, A., Craddock, N., Deloukas, P., Dronov, S., Duncanson, A., Edkins, S., Freeman, C., Gillman, M., Gray, E., Gwilliam, R., Hammond, N., Hunt, S.E., Jankowski, J., Jayakumar, A., Langford, C., Liddle, J., Markus, H.S., Mathew, C.G., McCann, O.T., McCarthy, M.I., Palmer, C.N., Peltonen, L., Plomin, R., Potter, S.C., Rautanen, A., Ravindrarajah, R., Ricketts, M., Samani, N., Sawcer, S.J., Strange, A., Trembath, R.C., Viswanathan, A.C., Waller, M., Weston, P., Whittaker, P., Widaa, S., Wood, N.W., McVean, G., Reveille, J.D., Wordsworth, B.P., Brown, M.A., Donnelly, P.; Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2) (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature Genet.* 43, 761-767.
55. Evavold, B.D., Sloan-Lancaster, J., Wilson, K.J., Rothbard, J.B. and Allen, P.M. (1995). Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* 2, 655-663.
56. Felix, N.J., Donermeyer, D.L., Horvath, S., Walters, J.J., Gross, M.L., Suri, A. and Allen, P.M. (2007). Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nat. Immunol.* 8, 388–397.
57. Feltkamp, T.E.W., Kahn, M.A. and López de Castro, J.A. (1996). The pathogenetic role of HLA-B27. *Immunol. Today* 17, 5-7.
58. Ferradini, L., Roman-Roman, S., Azocar, J., Michalaki, H., Triebel, F. and Hercend, T. (1991). Studies on the human T cell receptor α/β variable region genes II. Identification of four additional V β subfamilies. *Eur. J. Immunol.* 21, 935-942.
59. Fiorillo, M.T., Maragno, M., Butler, R., Dupuis, M.L. and Sorrentino, R. (2000). CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J. Clin. Invest.* 106, 47-53.
60. Fiorillo, M.T., Rückert, C., Hülsmeier, M., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A. and Uchanska-Ziegler, B. (2005). Allele-dependent similarity between viral and self-peptide presentation by HLA-B27 subtypes. *J. Biol. Chem.* 280, 2962-2971.
61. Flynn, C. (2013). Identifizierung arthritogener Peptide der Reaktiven Arthritis. Masterarbeit am Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
62. Frauendorf, E., von Goessel, H., May, E. and Märker-Hermann, E. (2003). HLA-B27-restricted T cells from patients with ankylosing spondylitis recognize peptides from B*2705 that are similar to bacteria-derived peptides. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 351-359.

63. Garboczi, D.N., Gosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
64. Garcia, K.C., Degano, M., Pease, L.R. Huang, M., Peterson, P.A., Teyton, L. and Wilson, I.A. (1996). An $\alpha\beta$ T cell structure at 2.5Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.
65. García-Medel, N., Sanz-Bravo, A., Van Nguyen, D., Galocha, B., Gómez-Molina, P., Martín-Esteban, A., Alvarez-Navarro, C. and de Castro, J.A. (2012). Functional interaction of the ankylosing spondylitis-associated endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism and HLA-B27 in vivo. *Mol. Cell. Proteomics*. 11, 1416-1429.
66. Gellert, M. (1992). Molecular analysis of V(D)J recombination. *Ann. Rev. Gen.* 26, 425-446.
67. Germain, R.N., (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
68. Giegerich, G., Pette, M., Meini, E., Epplen, J.T., Wekerle, H., and Hinkkanen, A. (1992). Diversity of T cell receptor α and β chain gene expressed by human T cells specific for similar myelin basic protein peptide/major histocompatibility complexes. *Eur. J. Immunol.* 22, 753-758.
69. Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
70. Gorer, O.A. (1938). The antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.* 47, 231-252.
71. Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A. and McMichael, A. (1987). Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature* 326, 881-882.
72. Granfors, K., Jalkanen, S., von Essen, R., Lahesmaa-Rantala, R., Isomäki, O., Pekkola-Heino, K., Merilahti-Palo, R., Saario, R., Isomäki, H. and Toivanen A. (1989) Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N. Engl. J. Med.* 320, 216-221.
73. Granfors, K., Jalkanen, S., Lindberg, A.A., Mäki-Ikola, O., von Essen, R., Lahesmaa-Rantala R., Isomäki, H., Saario, R., Arnold, W.J. and Toivanen, A. (1990). Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. *Lancet* 335, 685-688.
74. Hall, C., Berkhout, B., Alarcon, B., Sancho, J., Wileman, T. and Terhorst, C. (1991). Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int. Immunol.* 3, 359-368.
75. Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P. and Taurog, J.D. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63, 1099-1112.

76. Hammer, M., Zeidler, H., Klimsa, S. and Heesemann, J. (1990). *Yersinia enterocolitica* in the synovial membrane of patients with *Yersinia*-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 33, 1795-1780.
77. Hamrouni, A., Aublin, A., Guillaume, P. and Maryanski, J. (2003). T cell receptor gene rearrangement lineage analysis reveals clues for the origin of highly restricted antigen-specific repertoires. *J. Exp. Med.* 197, 601-614.
78. Han, M., Harrison, L., Kehn, P., Stevenson, K., Currier, J., and Robinson, M.A. (1999). Invariant or highly conserved TCR α are expressed on double-Negative (CD3⁺CD4⁻CD8) T cells. *J. Immunol.* 163, 301-311.
79. Hansen, T.H. and Bouvier, M. (2009). MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 503-513.
80. Haroon, N., Tsui, F.W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. and Inman, R.D. (2012). Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 589-595.
81. Harty J.T. and Badovinac, V.P. (2002). Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 360-365.
82. Hermann, E., Yu, D.T., Meyer zum Buschenfelde K.H. and Fleischer, B. (1993). HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 342, 646-650.
83. Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. and Blanquet S. (1989). Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86, 8247-8251.
84. Hohlfeld, R. and Engel, A.G. (1994). The immunobiology of muscle. *Immunol. Today* 15, 269-274.
85. Hülsmeier, M., Hillig, R.C., Volz, A., Ruhl, M., Schröder, W., Saenger, W., Ziegler, A. and Uchanska-Ziegler, B. (2002). HLA-B27 subtypes differentially associated with disease exhibit subtle structural alterations. *J. Biol. Chem.* 277, 47844-47853.
86. Hülsmeier, M., Fiorillo, M.T., Bettosini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A. and Uchanska-Ziegler, B. (2004). Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *J. Exp. Med.* 199, 271-281.
87. Huppa, J.B., Axmann M., Mörtelmaier, M.A., Lillemeier, B.F., Newell, E.W., Brameshuber, M., Klein, L.O., Schütz, G.J. and Davis M.M. (2010). TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* 463, 963–967.
88. Huseby, E .S., White, J., Crawford, F., Vass, T., Becker, D., Pinilla, C., Marrack, P. and Kappler, J.W. (2005). How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific. *Cell* 122 , 247–260.
89. International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J.P., Robinson, P.C., Karaderi, T., Leo, P., Cremin, K., Pryce, K.,

- Harris, J., Lee, S., Joo, K.B., Shim, S.C., Weisman, M., Ward, M., Zhou, X., Garchon, H.J., Chiocchia, G., Nossent, J., Lie, B.A., Førre, Ø., Tuomilehto, J., Laiho, K., Jiang, L., Liu, Y., Wu, X., Bradbury, L.A., Elewaut, D., Burgos-Vargas, R., Stebbings, S., Appleton, L., Farrah, C., Lau, J., Kenna, T.J., Haroon, N., Ferreira, M.A., Yang, J., Mulero, J., Fernandez-Sueiro, J.L., Gonzalez-Gay, M.A., Lopez-Larrea, C., Deloukas, P., Donnelly, P.; Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC); Groupe Française d'Etude Génétique des Spondylarthrites (GFEGS); Nord-Trøndelag Health Study (HUNT); Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Bowness, P., Gafney, K., Gaston, H., Gladman, D.D., Rahman, P., Maksymowycz, W.P., Xu, H., Crusius, J.B., van der Horst-Bruinsma, I.E., Chou, C.T., Valle-Oñate, R., Romero-Sánchez, C., Hansen, I.M., Pimentel-Santos, F.M., Inman, R.D., Videm, V., Martin, J., Breban, M., Reveille, J.D., Evans, D.M., Kim, T.H., Wordsworth, B.P. and Brown M.A. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* 45, 730-738.
90. Infantes, S., Lorente, E., Barnea, E., Beer, I., Barriga, A., Lasala, F., Jiménez, M., Admon, A. and López, D. (2013). Natural HLA-B*2705 protein ligands with glutamine as anchor motif: implications for HLA-B27 association with spondyloarthropathy. *J Biol Chem.* 288, 10882-10889.
91. Ishizuka, J., Stewart-Jones, G.B., van der Merwe, A., Bell, J.I., McMichael A.J., Jones, E.Y. (2008). The structural dynamics and energetics of an immunodominant T cell receptor are programmed by its Vbeta domain. *Immunity* 28, 171-182.
92. Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R., Wiley, D.C., 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353, 326–329.
93. Ji, Q., Perchetlet, A. and Goverman, J.M. (2010). Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol.* 11, 628-634.
94. Jores, R., Alzari, O.M., and Meo, T. (1990). Resolution of hypervariable regions in T-cell receptor beta chains by a modified Wu-Kabat index of amino acid diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9138-9142.
95. Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R. and Dornmair K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130, 2789-2799.
96. Karttunen, J. and Shastri, N. (1991). Measurements of ligand induced activation in single viable T cells using lacZ reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3972-3976.
97. Katayama, C.D., Eidelman, F.J., Duncan, A., Hooshmand, F., and Hedrick, S.M. (1995). Predicted complementarity determining regions of the T cell receptor determine antigen specificity. *EMBO J.* 14, 927-938.
98. Kekäläinen, E., Hänninen, A., Maksimowicz, A. and Arstila, T.P. (2010). T cells expressing two different T cell receptors form a heterogeneous population containing autoreactive clones. *Mol. Immunol.* 48, 211-218.

99. Khan, M.A. (2002). Update on spondylarthropathies. *Ann. Intern. Med.* 136, 896-907.
100. Khan M.A. (2013). Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15:362.
101. Kim, S.M., Bhonsle, L., Besgen, P., Nickel, J., Backes, A., Held, K., Vollmer, S., Dornmair, K., and Prinz, J.C. (2012). Analysis of the paired TCR α - and β -chains of single human T cells. *PLoS One.* 7:e37338.
102. Kobayashi, E., Mizukoshi, E., Kishi, H., Ozawa, T., Hamana, H., Nagai, T., Nakagawa, H., Jin, A., Kaneko, S. and Muraguchi, A. (2013). A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of patients with cancer within 10 days. *Nat Med.* 19, 1542-1546.
103. Kollnberger, S., Bird, L.A., Sunm, M.-Y., Retiere, C., Braud, V.M., McMichael, A. and Bowness, P. (2002). Cell surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum.* 46, 2972–2982.
104. Kollnberger, S., Bird, L.A., Roddis, M., Hacquard-Bouder, C., Kubagawa, H., Bodmer, H.C., Breban, M., McMichael, A.J. and Bowness, P. (2004). HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J. Immunol.* 173,1699-1710.
105. Koop, B.F., Rowen, L., Wang, K., Kuo, C.L., Seto, D., Lenstra, J.A., Howard, S., Shan, W., Deshpande, P. and Hood, L. (1994). The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics* 19, 478-493.
106. Kozak, M. (1987a). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* 15, 8125-8148.
107. Kozak, M. (1987b). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3438–3445.
108. Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Bio.* 108, 229-241.
109. Kozak, M. (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* 29, 5226–5232.
110. Kuon, W., Holzhütter, H.G., Appel, H., Grolm, M., Kollnberger, S., Traeder, A., Henklein, P., Weiss, E.H., Thiel, A., Lauster, R., Bowness, P., Radbruch, A., Kloetzel, P.M., and Sieper, J. (2001). Identification of HLA-B27 restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J. Immunol.* 167, 4738-4746.
111. Kuon, W. and Sieper., J. (2003). Identification of HLA-B27-restricted peptides in reactive arthritis and other spondyloarthropathies: computer algorithms and fluorescent activated cell sorting analysis as tools for hunting of HLA-B27-restricted chlamydial and autologous crossreactive peptides involved in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 29, 595-611.

112. Kuon, W., Kuhne, M., Busch, D.H., Atagunduz, P., Seipel, M., Wu, P., Morawitz, L., Fernahl, G., Appel, H., Weiss, E.H., Krenn, V. and Sieper, J. (2004). Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondylarthropathy. *J. Immunol.* 173, 4859-4866.
113. Laito, P., Virtala, M., Salmi, M., Pelliniemi, L.j., Yu, D.T.Y. and Granfors, K. (1997). HLA-B27 modulates intracellular survival of salmonella enteritidis in human monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 1331-1338.
114. Lahesmaa, R., Skurnik, M., Granfors, K., Mottonen, T., Saario, R., Toivanen A., and Toivanen, P. (1992). Molecular mimicry in the pathogenesis of spondylarthropathies. A critical appraisal of cross-reactivity between microbial antigens and HLA-B27. *Br. J. Rheumatol.* 31, 221-229.
115. Le Bouteiller, P. and Lenfant, F. (1996). Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res. Immunol.* 147, 301-313.
116. Lefranc, M.-P. and Lefran, G. (2001). *The T Cell Receptor Facts Book*. (London, UK: Academic Press). ISBN: 012441351X.
117. Lehner, P.J., Wang, E.C., Moss, P.A., Williams, S., Platt, K., Friedman, S.M., Bell, J.I. and Borysiewicz, L.K. (1995). Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J. Exp. Med.* 181, 79-91.
118. Leirisalo-Repo, M. (1998). Prognosis, course of disease, and treatment of the spondyloarthropathies. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 24, 737-751
119. Leirisalo-Repo, M. (2005). Reactive arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 34, 251-259.
120. Lenart, I., Guiliano, D.B., Burn, G., Campbell, E.C., Morley, K.D., Fussell, H., Powis, S.J. and Antoniou, A.N. (2012). The MHC class I heavy chain structurally conserved cysteines 101 and 164 participate in HLA-B27 dimer formation. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 33-43.
121. Letourner, F. and Malissen B. (1989). Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor α and β chain transcripts reveals a non-functional α -mRNA of BW5147 origin. *Eur. J. Immunol.* 19, 2269-2274.
122. Liang, X., Weigand, L.U., Schuster, I.G., Eppinger, E., van der Griendt, J., Schub, A., Leisegang, M., Sommermeyer, D., Anderl, F., Han, Y., Conrad, H., Ellwart, J., Bernhard, H., Moosmann, A., Busch, D.H., Uckert, W. and Krackhardt, A.M. Homo sapiens isolate HER2-3 T cell receptor alpha chain mRNA, complete cds. Unpubliziert, Zugriffsnummer ACY74600.
123. Linnemann, C., Heemskerk, B., Kvistborg, P., Kluin, R.J., Bolotin, D.A., Chen, X., Bresser, K., Nieuwland, M., Schotte, R., Michels, S., Gomez-Eerland, R., Jahn, L., Hombrink, P., Legrand, N., Shu, C.J., Mamedov, I.Z., Velds, A., Blank, C.U., Haanen, J.B., Turchaninova, M.A., Kerkhoven, R.M., Spits, H., Hadrup, S.R., Heemskerk, M.H., Blankenstein, T., Chudakov, D.M., Bendle, G.M. and Schumacher, T.N. (2013). High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med.* 19, 1534-1541.

124. Long, E.O.; Rosen-Bronson, S., Karp, D.R., Malnati, M., Sekaly, R.P. and Jarquemada, D. (1991). Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum. Immunol.* 31, 229-235.
125. Lopéz de Castro, J.A. (1998). The pathogenic role of HLA-B27 in chronic arthritis. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 59-66.
126. Lopéz de Castro, J.A., Alvarez, I., Marcilla, M., Paradela, A., Ramos, M., Sesma, L. and Vázquez, M. (2004). HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* 63, 424–445.
127. Lopéz de Castro, J.A., (2005). HLA-B27: portraying immunodominant viral epitopes. *Eur. J. Immunol.* 35, 336-340.
128. López de Castro JA. (2010). The HLA-B27 peptidome: building on the cornerstone. *Arthritis Rheum.* 62, 316-319.
129. López de Castro JA. (2014). The pathogenesis of ankylosing spondylitis: HLA-B27 and beyond. *Mol. Immunol.* 57, 1.
130. Lutterotti, A., Yousef, S., Sputtek, A., Stürner, K.H., Stellmann, J.P., Breiden, P., Reinhardt, S., Schulze, C., Bester, M., Heesen, C., Schippling, S., Miller, S.D., Sospedra, M. and Martin, R. (2013). Antigen-specific tolerance by autologous myelin peptide-coupled cells: a phase 1 trial in multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 5, 188ra75.
131. Mantovani, S., Palermo, B., Garbelli, S., Campanelli, R., Robustelli Della Cuna, G., Gennari, R., Benvenuto, F., Lantelme, E. and Giachino C. (2002). Dominant TCR-alpha requirements for a self antigen recognition in humans. *J. Immunol.* 169, 6253-6260.
132. Marcilla, M. and López de Castro, J.A. (2008). Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 71, 495-506.
133. May, E., Märker-Hermann, E., Wittig, B.M., Zeitz, M., Meyer zum Buschenfelde, K.H. and Duchmann, R. (2000). Identical T-cell expansions in the colon mucosa and the synovium of a patient with enterogenic spondyloarthropathy. *Gastroenterology* 119, 1745–1755.
134. May, E., Dulphy, N., Frauendorf, E., Duchman, R., Bowness, P., Lopéz de Castro, J.A., Toubert, A. and Märker-Hermann, E. (2002). Conserved TCR β chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens* 60, 299-308.
135. May, E., Dorris, M.L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M.I., Lightfoot, E. and Taurog, J.D. (2003). CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol.* 170, 1099-1105.
136. Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A. and Wilson, I.A. (1992). Emerging Principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257, 927-934.

137. McHugh, K. and Bowness, P. (2012). The link between HLA-B27 and SpA - new ideas on an old problem. *Rheumatology (Oxford)* 51, 1529-1539.
138. Mear, J.P., Schreiber, K.L., Münz, C., Zhu, X., Stevanović, S., Rammensee, H.G., Rowland-Jones, S.L. and Colbert, R.A. (1999). Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J. Immunol.* 163, 6665-6670.
139. Medana, I.M., Gallimore, A., Oxenius, A., Marinic, M.M., Wekerle, H. and Neumann, H. (2000). MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* 30, 3623-3633.
140. Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgson, J.C., Schlossmann, S.F. and Reinherz, E.L. (1983). Clonotypic structures involved in antigen-specific human T-cell function. *J. Exp. Med.* 157, 705-719.
141. Morris, G. P. and Allen, P.M. (2012). How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat. Immunol.* 13, 121-128.
142. Moss, P.A., Moots, R.J., Rosenberg, W.M., Rowland-Jones, S.J., Bodmer, H.C., McMichael, A.J. and Bell, J.I. (1991). Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 8987-8990.
143. Moss, P.A. and Bell, J.I. (1995). Sequence analysis of the human alpha beta T-cell-receptor CDR3 region. *Immunogenetics* 42, 10-18.
144. Müller, M.R. and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 645-656.
145. Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K. and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature Rev. Immunol.* 4, 123-132.
146. Oldstone, M.B. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819-820.
147. Ozawa, T., Tajiri, K., Kishi, H. and Muraguchi, A. (2008). Comprehensive analysis of the functional TCR repertoire at the single-cell level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 820-825.
148. Padovan, E., Casirati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. and Lanzavecchia, A. (1993). Expression of T-cell receptor α chains: dual receptor T-cells. *Science* 262, 422-424.
149. Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Valitutti, S., Acuto, O. und Lanzavecchia, A. (1995). Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor β chains: Implication for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 181, 1587-1591.
150. Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class-I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.
151. Pannetier, C., Even, J., and Kourouk, P. (1995). T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16, 176-181.

152. Paradela, A., Alvarez, I., García-Peydró, M., Sesma, L., Ramos, M., Vázquez, J. and López De Castro, J.A. (2000). Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J Immunol.* 164, 329-337.
153. Parham, P., Barnstable, C.J., and Bodmer, W.F. (1979). Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A, B, C, antigens. *J. Immunol.* 123, 342-349.
154. Peh, C.A., Burrow, S.R., Barnden, M., Khanna, R., Cresswell, P., Moss, D.J., and McClukey, J., (1998). HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 5, 531-542.
155. Penttinen, M.A., Heiskanen, K.M., Mohapatra, R., DeLay, M.L., Colbert, R.A., Sistonen, L. and Granfors K. (2004). Enhanced intracellular replication of *Salmonella enteritidis* in HLA-B27-expressing human monocytic cells: Dependency on glutamic acid at position 45 in the B pocket of HLA-B27. *Arthritis Rheum.* 50, 2255-2263.
156. Pihlgren, M., Duboi, P.M., Tomkowiak, M., Sjogren, T., and Marvel, J. (1996). Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J. Exp. Med.* 184, 2141-2151.
157. Prinz, P. (2007). Expressions- und funktionelle Untersuchungen von T-Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit eines Patienten mit Reaktiver Arthritis zur Charakterisierung von pathogenen T-Zellklonen. Diplomarbeit am Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
158. Proudfoot, N. J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25, 1770-1782.
159. Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D. and López de Castro JA. (2002a). Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 37573-37581.
160. Ramos, M. and López de Castro, J.A. (2002b). HLA-B27 and the pathogenesis of spondylarthritis. *Tissue Antigens* 60, 191-205.
161. Reiser, J.B., Darnault, C., Grégoire, C., Mosser, T., Mazza, G., Kearney, A., van der Merwe P.A., Fontecilla-Camps, J.C., Housset, D. and Malissen, B. (2003). CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nat. Immunol.* 4, 241-247.
162. Roddis, M., Carter, R.W., Sun, M-Y., Weissensteiner, T., McMichael A.J., Bowness P. and Bodmer H.C. (2004). Fully functional HLA B27-restricted CD4⁺ as well as CD8⁺ T cell responses in TCR transgenic mice. *J. Immunol.* 172, 155-161.
163. Rowen, L., Koop, B.F. and Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.

164. Rückert, C., Fiorillo, M.T., Loll, B., Moretti, R., Biesiadka, J., Saenger, W., Ziegler, A., Sorrentino, R. and Uchanska-Ziegler, B. (2006). Conformational dimorphism of self-peptides and molecular mimicry in a disease-associated HLA-B27 subtype. *J. Biol. Chem.* 28, 2306-2316.
165. Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 419–466.
166. Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
167. Saito, T., Weiss, A., Miller, J., Norcross, M.A., and Germain, R.N. (1987). Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine T_i $\alpha\beta$ -human T3 receptor complexes. *Nature* 325, 125-130.
168. Salter, R.D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett, T. P., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R. and Parham, P. (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the α 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345, 41-46.
169. Samelson, L.E., Patel, M.D., Weissman, A.M., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1986). Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46, 1083-1090.
170. Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Schlissel, M.S., (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Ann. Rev. Immunol.* 10, 359-383.
171. Schönwetter-Steer, M. (2005). Molekulargenetische und funktionelle Untersuchungen zur Identifizierung des pathogenen T-Zellrezeptors bei der Reaktiven Arthritis. Diplomarbeit am Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
172. Schwimmbeck, P.L., Yu, D.T. and Oldstone, M.B. (1987). Autoantibodies to HLA B27 in the sera of HLA B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 166, 173-181.
173. Scofield, R.H., Kurien, B., Gross, T., Warren, W.L. and Harley, J.B. (1995). HLA-B27 binding of peptide from its own sequence and similar peptides from bacteria: implications for spondyloarthropathies. *Lancet* 17, 1542-1544.
174. Seitz, S., Schneider, C.K., Malotka, J., Nong X., Engel, A. G., Wekerle, H., Hohlfeld, R. and Dornmair, K. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12057-12062.
175. Selmi, C., Gershwin, M.E. (2014). Diagnosis and classification of reactive arthritis. *Autoimmun. Rev.* pii: S1568-9972(14)00017-2.
176. Sesma, L., Montserrat, V., Lamas, J.R., Marina, A., Vázquez, J. and López de Castro, J.A. (2002). The peptide repertoires of HLA-B27 subtypes differentially associated to spondyloarthropathy (B*2704 and B*2706) differ by specific changes at three anchor positions. *J. Biol. Chem.* 277, 16744-16749.

177. Sesma, L., Galocha, B., Vázquez, M., Purcell, A.W., Marcilla, M., McCluskey, J. and López de Castro, J.A. (2005). Qualitative and quantitative differences in peptides bound to HLA-B27 in the presence of mouse versus human tapasin define a role for tapasin as a size-dependent peptide editor. *J. Immunol.* 174, 7833-7844.
178. Sieper, J., Braun, J., Wu, P., and Kingsley, G. (1993). T cells are responsible for the enhanced synovial cellular immune response to triggering antigen in reactive arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 91, 96-102.
179. Siewert, K. (2011). Autoaggressive human T cell receptors and their antigen specificities. Dissertation in Molecular Immunology to the Faculty of Mathematics and Natural Science, University of Potsdam
180. Siewert, K., Malotka, J., Kawakami, N., Wekerle, H., Hohlfeld, R. and Dornmair, K. (2012). Unbiased identification of target antigens of CD8⁺ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nature Med.* 18, 824-828.
181. Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2013). Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation. *Molecular Cell* 51, 249–264.
182. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G. A. and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 591-619.
183. Stewart-Jones, G. B. E., di Gleria, K., Kollnberger, S., McMichael, A.J., Jones, E.Y. and Bowness, P. (2005). Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *Eur. J. Immunol.* 35, 341-351.
184. Stinissen, P., Raus, J. and Zhang, J. (1997). Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapy strategies. *Crit. Rev. Immunol.* 17, 33-75.
185. Stoll, M.L (2011). Interactions of the innate and adaptive arms of the immune system in the pathogenesis of spondyloarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29, 322-330.
186. Sun, X., Saito, M., Sato, Y., Chikata, T., Naruto, T., Ozawa, T., Kobayashi, E., Kishi, H., Muraguchi, A. and Takiguchi, M. (2012). Unbiased analysis of TCR α/β chains at the single-cell level in human CD8⁺ T-cell subsets. *PLoS One.* 7, e40386.
187. Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J. and Eisen, H.N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565 – 571.
188. Taurog, J.D., Maika, S.D., Simmons, W.A., Breban, M. and Hammer, R.E. (1993). Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J. Immunol.* 150, 4168-4178.
189. Taurog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J.L., Balish, E. and Hammer R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* 180, 2359-2364.

190. Thureau, S.R., Wildner, G., Kuon, W., Weiss, E.H. and Riethmüller, G. (1989). Expression and immunogenicity of HLA-B27 in high-transfection recipient P815: a new method to induce monoclonal antibodies directed against HLA-B27. *Tissue Antigens* 33, 511-519.
191. Thureau, S.R., Fricke, H., Burchardi, C., Diedrichs-Moehring, M. and Wildner, G. (2004). Long-term follow-up of oral tolerance induction with HLA-peptide B27PD in patients with uveitis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1029, 408–412.
192. Tisch, R. and McDevitt, H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297.
193. Toivanen, A. and Toivanen, P. (2004). Reactive arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 18, 689-703.
194. Townsend, A., Elliott, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B. and Tse, A. (1990). Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62, 285–295.
195. Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Vadasz, V., Chin, B. and Mak, T.W. (1985). Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 8624-8628.
196. Tunnaclyffe, A., Kefford, R., Milstein, C., Forster, A. and Rabbitts, T.H. (1985). Sequence and evolution of the human T-cell antigen receptor beta-chain genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 5068-5072.
197. Turner, M.J., Sowders, D.P., DeLay, M.L., Mohapatra, R., Bai, S., Smith, J.A., Brandewie, J.R., Taurog J.D. and Colbert R.A. (2005). HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J. Immunol.* 175, 2438-2448.
198. Tysoe-Calnon, V.A., Grundy, J.E. and Perkins, S.J. (1991). Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences. *Biochem. J.* 277, 359-369.
199. Uchanska-Ziegler, B., Loll, B., Fabian, H., Hee, C.S., Saenger, W. and Ziegler, A. (2012). HLA class I-associated diseases with a suspected autoimmune etiology: HLA-B27 subtypes as a model system. *Eur J. Cell Biol.* 91, 274-286.
200. Ugrinovic, S., Mertz, A., Wu, P., Braun, J. and Sieper, J. (1997): A single nonamer from the Yersinia 60-kDa heat shock protein is the target of HLA-B27-restricted CTL response in Yersinia-induced reactive arthritis. *J. Immunol.* 159, 5715-5723.
201. Urban, R.G., Chicz, R.M., Lane, W.S., Strominger, J.L., Rehm, A., Kenter, M.J., UytdeHaag, F.G., Ploegh, H., Uchanska-Ziegler, B. and Ziegler, A. (1994). A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 1534-1538.
202. Valitutti, S., Müller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC-complexes. *Nature* 375, 148-151.

203. Wang, J., Tsai, S., Shamel, A., Yamanouchi, J., Alkemade, G. and Santamaria, P. (2010). In situ recognition of autoantigen as an essential gatekeeper in autoimmune CD8+ T cell inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 9317-9322.
204. Weiss, E.H., Kuon, W., Dörner, C., Lang, M. and Riethmüller, G. (1985). Organization, sequence and expression of the HLA-B27 gene: A molecular approach to analyse HLA and disease associations. *Immunobiol.* 170, 367-380.
205. Wiendl, H., Malotka, J., Holzwarth, B., Weltzien, H.U., Wekerle, H., Hohlfeld, R. and Dornmair, K. (2002). An autoreactiv $\gamma\delta$ TCR derived from a polymyositis lesion. *J. Immunol.* 169, 515-521.
206. Willenbrock, K., Ichinohasama, R., Kadin, M.E., Miura, I., Terui, T., Meguro, K., Fukuhara, O., DeCoteau, J.F. and Hansmann, M.L. (2002). T-cell variant of classical Hodgkin's lymphoma with nodal and cutaneous manifestations demonstrated by single-cell polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* 82 1103-1109.
207. Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K. and Hood, L.E. (1988). Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor α and β chain gene families. *Immunol. Rev.* 101, 149-204.
208. Wiltschi, B., Merkel, L. and Budisa, N. (2009). Fine tuning the N-terminal residue excision with methionine analogues. *Chembiochem.* 10, 217-220.
209. Wong, F.S., Karttunen, J., Dumont, C., Wen, L., Visintin, I., Pilip, I.M., Shastri, N., Pamer, E.G. and Janeway CA Jr. (1999). Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat. Med.* 5, 1026-1031.
210. Wong-Baeza, I., Ridley, A., Shaw, J., Hatano, H., Rysnik, O., McHugh, K., Piper, C., Brackenridge, S., Fernandes R., Chan, A., Bowness, P. and Kollnberger, S. (2013). KIR3DL2 binds to HLA-B27 dimers and free H chains more strongly than other HLA class I and promotes the expansion of T cells in ankylosing spondylitis. *J. Immunol.* 190, 3216-3224.
211. Wooldridge, L., Ekeruche-Makinde, J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Miles, J.J., Tan, M.P., Dolton, G., Clement, M., Llewellyn-Lacey, S., Price, D.A., Peakman, M. and Sewell, A.K. (2012). A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J. Biol. Chem.* 287, 1168-1177.
212. Wooldridge, L. (2013). Individual MHCI-Restricted T-Cell Receptors are Characterized by a Unique Peptide Recognition Signature. *Front. Immunol.* 4, 199.
213. Wu, L.C., Tuot, D.S., Lyons, D.S., Garcia, K.C. and Davis, M.M. (2002). Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature* 418, 552–556.
214. Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 10, 695-705.

215. Wucherpfennig, K.W., Allen, P.M., Celada, F., Cohen, I.R., De Boer, R., Garcia, K.C., Goldstein, B., Greenspan, R., Hafler, D., Hodgkin, P., Huseby, E.S., Krakauer, D.C., Nemazee, D., Perelson, A.S., Pinilla, C., Strong, R.K. and Sercarz E.E. (2007). Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition. *Semin. Immunol.* 19, 216-224.
216. Yoshikai, Y., Clark, S.P., Taylor, S., Sohn, U., Wilson, B.I., Minden, M.D. and Mak, T.W. (1985). Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor alpha-chain. *Nature* 316, 837-840.
217. Zhang, L., Man, S.M., Day, A.S., Leach, S.T., Lemberg, D.A., Dutt, S., Stormon, M., Otley, A., O'Loughlin, E.V., Magoffin, A., Ng P.H. and Mitchell, H. (2009). Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C. jejuni* from children with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 47, 453-455.
218. Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semiallogenic system. *Nature* 248, 701-702.
219. Zou, J., Appel, H., Rudwaleit, M., Thiel, A. and Sieper, J. (2005). Analysis of the CD8+ T cell response to the G1 domain of aggrecan in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 722-729.
220. Zumla, A., Marguerie, C., So, A., Yokoyama, W.M., Saito, T., Batchelor, J.R. and Lechler, R.I. (1992). Co-expression of human T cell receptor chains with mouse CD3 on the cell surface of a mouse T cell hybridoma. *J. Immunol. Methods* 149, 69-76.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ALF	Automatischer Sequenzierer mit Laserdetektion (<i>automated laser fluorescence</i>)
Abb.	<u>Ab</u> bildung
amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfate
APZ	<u>A</u> ntigen- <u>P</u> räsentierende <u>Z</u> elle
AS	<u>A</u> minosäure
AS	<u>A</u> nkylosierende <u>S</u> pondylitis
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
bp	<u>B</u> asenpaare
blast ^R	<u>B</u> lasticidin- <u>R</u> esistenz
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Oberflächenantigenomenklatur (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNS	komplementäre <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementary determining region</i>)
cfu	<i>Colony forming units</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cy5	<u>C</u> ytochrom <u>5</u> Fluoreszenzfarbstoff
DAG	Diacylglycerol
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
dNTP	2'- <u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleosid-5'- <u>T</u> riphosphat
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
EtBr	<u>E</u> thidium <u>b</u> romid
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat
G418	<u>G</u> eneticin- <u>4</u> 18
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
hygro ^R	<u>H</u> ygromycin- <u>R</u> esistenz
IFN-g	<u>I</u> nterferon- <u>g</u>
IL	<u>I</u> nterleukin
IP ₃	Inositol Triphosphat
ITAM	<u>I</u> mmunrezeptor <u>T</u> yrosin-basiertes <u>a</u> ktivierendes <u>M</u> otiv
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horse Radish Peroxidase</i>)
kana ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	<u>K</u> ilodalton
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
neo ^R	<u>N</u> eomycin- <u>R</u> esistenz

NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NK	Negativ-Kontrolle
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
ori	origin of replication
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerithrin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PIP ₂	Phosphatidylinositol Biphosphat
PLC-g	Phospholipase C-g
PK	Positiv-Kontrolle
puro ^R	Puromycin-Resistenz
ReA	Reaktive Arthritis
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute of rotor</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous Sarkoma Virus
SF	Synovialflüssigkeit
SFMC	Mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit
sGFP	super grün fluoreszierendes Protein (<i>super Green Fluorescent Protein</i>)
SOC-Medium	Super Optimal broth with Catabolite repression-Medium
SpA	Spondylarthritiden
SV40	Simian Virus 40
T _A	Anlagerungstemperatur (<i>annealing temperature</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	hitze stabile Polymerase von <i>Thermophilus aquaticus</i>
TAP	transporter associated with antigen processing
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline (Tris-gepufferte Saline)
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TET	5-Tetrachloro-Fluorescein
T _M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan Monolaurat
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit für die Enzymaktivität (<i>unit</i>)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-Galactosid
ZAP-70	ζ-Ketten-assoziiertes-Protein
ZTL	Zytotoxische T-Zelle

9.2 Sequenzen veröffentlichter Oligonukleotide

Spezifische Oligonukleotide für die Sequenzen der TZR α -Ketten:

5'-Primer aller TRAV-Gensegmentfamilien der α -Kette (Han et al., 1999):

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Länge/GC-Anteil %/T _M
VA1B	CTG AGG AAA CCC TCT GTG CA	20-mer/55 %/59,4°C
VA2	GAT GGA AGG TTT ACA GCA CAG CTC	24-mer/50 %/62,7°C
VA3	CAC AGT GGA AGA TTA AGA GTC ACG C	25-mer/58 %/63°C
VA4A	AAC AGA ATG GCC TCT CTG GC	20-mer/55 %/59,4°C
VA4B	GGA TTG CGC TGA AGG AAG AG	20-mer/55 %/59,4°C
VA5	TGA AGG TCA CCT TTG ATA CCA CCC	24-mer/50 %/62,7°C
VA6	AAT CCG CCA ACC TTG TCA TCT CCG	24-mer/54,2 %/64,4°C
VA7	AAC TGCACGTAC CAG ACA TC	20-mer/50 %/57,3°C
VA8	ACC CTG AGT GTC CAG GAG GG	20-mer/65 %/63,5°C
VA9	CAC TGC TGA CCT TAA CAA AGG CG	23-mer/52,2 %/62,4°C
VA10	TCC TGG TGA CAG TAG TTA CG	20-mer/50 %/57,3°C
VA11	AGG CTC AAA GCC TTC TCA GCA GGG	24-mer/58,2 %/66,1°C
VA12	TCC ACC AGT TCC TTC AAC TTC ACC	24-mer/50 %/62,7°C
VA13	TTC ATC AAA ACC CTT GGG GAC AGC	24-mer/50 %/62,7°C
VA14	CCC AGC AGG CAG ATG ATT CTC GTT	24-mer/54,2 %/64,4°C
VA15	GGA TAA ACA TCT GTC TCT GCG	21-mer/47,6 %/57,9°C
VA15	AAG GGA ATC CTC TGA CTG TG	20-mer/50 %/57,3°C
VA17	GAT AGC CAT ACG TCC AGA TG	20-mer/50 %/57,3°C
VA18	TGC CAC TCT TAA TAC CAA GGA GGG	24-mer/50 %/62,7°C
VA19	ACA CTG GCT GCA ACA GCA TC	20-mer/55 %/59,4°C
VA20	TTA CAA ACG AAG TGG CCT CC	20-mer/50 %/57,2°C
VA21	ACC CTG CTG AAG GTC CTA CAT TCC	24-mer/54,2 %/64,4°C
VA22	CTT GGA GAA AGG CTC AGT TC	20-mer/50 %/57,3°C
VA23	TGC CTC GCT GGA TAA ATC ATC AGG	24-mer/50 %/62,7°C
VA24	TCC CAG CTC AGC GAT TCA GCC TCC	24-mer/62,5 %/67,8°C
VA25	GTC CTG TCC TCT TGA TAG CC	20-mer/55 %/59,4°C
VA26	AGC CCA GCC ATG CAG GCA TCT ACC	24-mer/62,5 %/67,8°C
VA27	TTG ATA CCA AAG CCC GTC TC	20-mer/50 %/57,3°C
VA28	GAA CAT CAC AGC CAC CCA GAC CGG	24-mer/62,5 %/67,8°C
VA29	GCA AAG CTC CCT GTA CCT TAC GG	23-mer/56,5 %/64,2°C
VA30	TTT CTG CAC AGC ACA GCC CC	20-mer/60 %/61,4°C
VA31	AGC AAA AAC TCT GGA GGC GG	20-mer/55 %/59,4°C
VA32	AAG GAG AGG ACT TCA CCA CG	20-mer/55 %/59,4°C

3'-Primer für TRAC-Gensegment der α -Kette (Han et al., 1999) :

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Länge/GC-Anteil %/T _M
TCA4	GTT GCT CTT GAA GTC CAT AGA CC	23-mer/47,8 %/60,6°C
TCRAC	GCA GAC AGA CTT GTC ACT GG	20-mer/55 %/59,4°C

Oligonukleotide zur Amplifikation des Plasmid-kodierten Antigens in pcDNAlib und Sequenzierung des Antigens in pcDNA3.1-TOPO:

(Siewert et al., 2012)

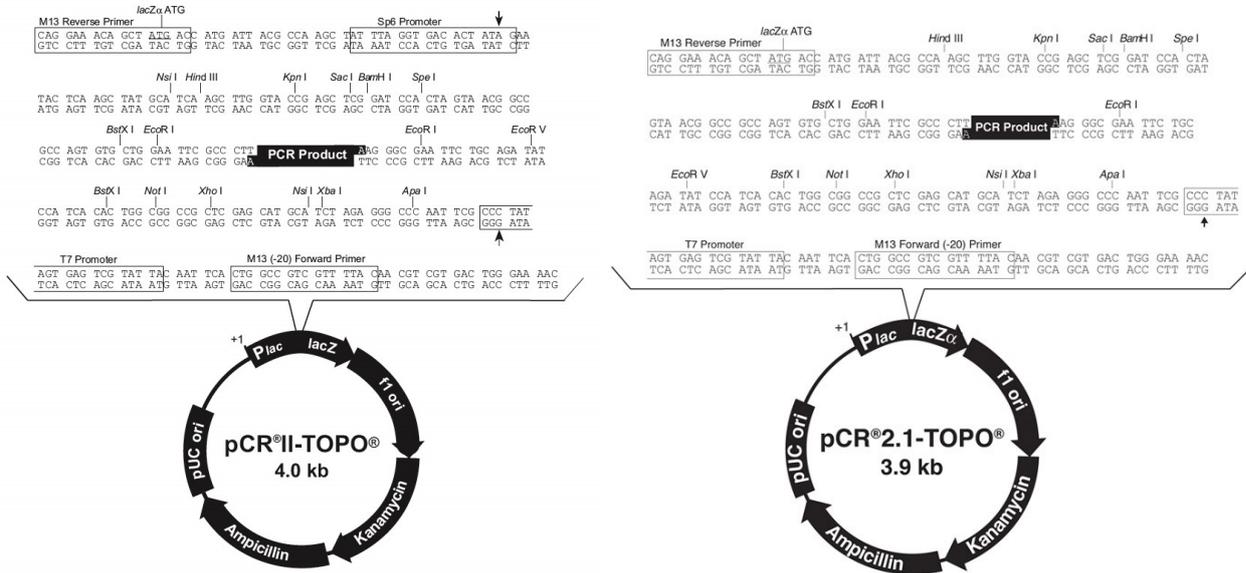
Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Spezifität
pcDNA2 nd -for-TOPO	<u>CAC CTC</u> CGG CGC GCC ACC ATG	5'-Primer pcDNA TM 3.1D/V5-His-TOPO Klonierung mit 5'CACC
pcDNA-rev-3	TGG TGA TGG TGA TGA TGA CC	3'-Primer zur TOPO Klonierung
pcDNA-for-1	CAC TGC TTA CTG GCT TAT CG	5'-Primer in pcDNA3.1-TOPO (96 bp stromaufwärts von pcDNA2 nd -for-TOPO)
pcDNA-rev-1	ACT AGA AGG CAC AGT CGA GG	3'-Primer in pcDNA 3.1-TOPO (stromabwärts von pcDNA-rev-3)

Oligonukleotide für die PCR-Analyse des pCR[®]2.1-TOPO-Vektors / pCR II-Vektors

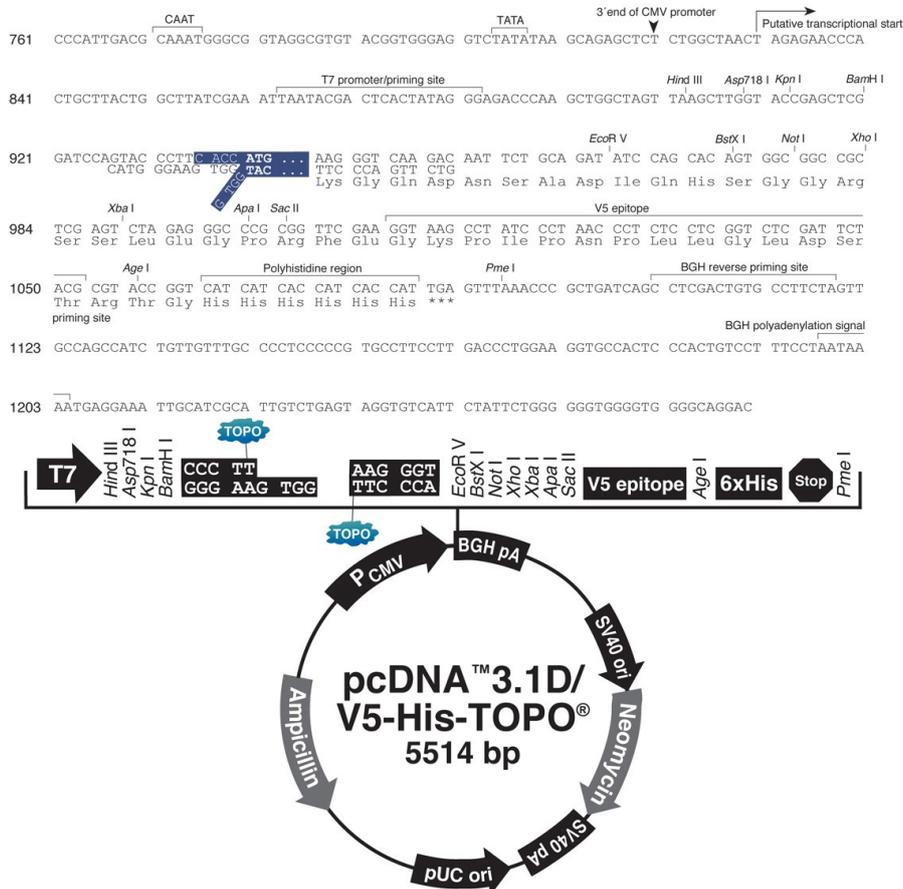
Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Spezifität Länge/GC-Anteil %/T _M
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	5'-Primer vor PCR-Produkt 17-mer/52,9 %/52,7°C
M13(-20) universal	GTA AAA CGA CGG CCA GT	3'-Primer nach PCR-Produkt 17-mer/52,9 %/52,7°C

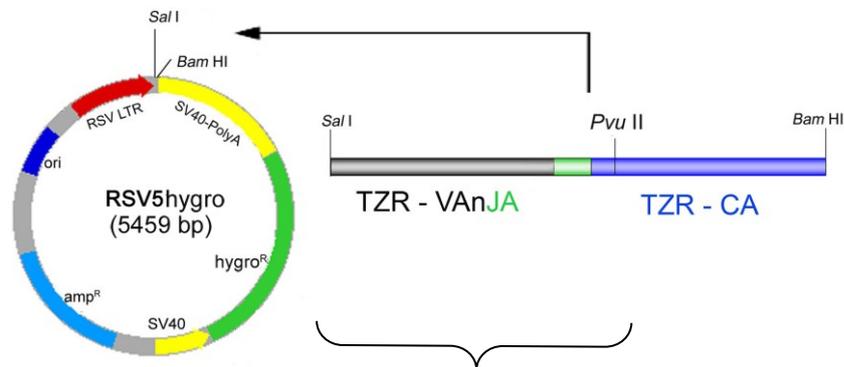
9.3 Verwendete Vektoren

pCR®II-TOPO®-Vektor und pCR® 2.1-TOPO®



pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO®



RSV5hygro**RSVhygro_leer**

5'-Primer Hygro_LTR

CAGAGATATT GTATTTAAGT GCCTAGCTCG ATACAATAAA CGCCATTTGA CCATTCACCA CATTGGTGTG

5'Primer RSVhygro_for

Sal I EcoR V Pvu II 3'Primer TCRAC

CACCTCCAAG CTTGGGCTGC AGGTCGACTG AGGTGATATC GCCTTCCAGC TGAGAGACTC TAAATCCAGT

Q L R D S K S S

GACAAGTCTG TCTGCCTATT CACCGATTTT GATTCTCAA CAAATGTGTC ACAAAGTAAG GATTCTGATG

D K S V C L F T D F D S Q T N V S Q S K D S D

3'Primer TCA4

TGTATATCAC AGACAAAAC TGTCTAGACA TGAGGTCTAT GGACTTCAAG AGCAACAGTG CTGTGGCCTG

V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V A W

GAGCAACAAA TCTGACTTTG CATGTGCAAA CGCCTTCAAC AACAGCATT A TCCAGAAGA CACCTTCTTC

S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F

CCCAGCCCAG AAAGTTCCTG TGATGTCAAG CTGGTCGAGA AAAGCTTTGA AACAGATACG AACCTAAACT

P S P E S S C D V K L V E K S F E T D T N L N

TTCAAACCT GTCAGTGATT GGGTTCGAA TCCTCCTCCT GAAAGTGCC GGGTTTAATC TGCTCATGAC

F Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T

GCTGCGGCTG TGGTCCAGTT GAGGATCCGCG

L R L W S S * Bam HI

Abbildung 23: Schematische Darstellung des Expressionsvektors RSV5hygro sowie die veränderte Sequenz des Vektors zu RSV5hygro_leer

Über die Schnittstellen *Sal I* und *Pvu II* wurden jeweils die LVAnJACA(*Pvu II*)-cDNS-Sequenzen der TZR α -Kette-Kandidaten-Ketten in den Expressionsvektor RSV5hygro einkloniert und mit dem im Vektor bereits inserierten *Pvu II/Bam HI*-Fragment des CA-Elements zu vollständig kodierenden α -Ketten komplettiert.

Darunter dargestellt ist die Sequenz des veränderten Vektors RSVhygro_leer zur Veranschaulichung der Bindestellen der verwendeten Primer. Überhalb der Nukleotidsequenz sind die Restriktionschnittstellen sowie die Primerbindungen (unterstrichen) und unterhalb ist ein Teil der kodierenden Aminosäuresequenz der CA-Region von der *Pvu II*- bis zur *Bam HI* Schnittstelle angegeben.

pBRdel:

(pBR328 Del *Pvu* II/*Eco*R V; ohne Chloramphenicol^R)

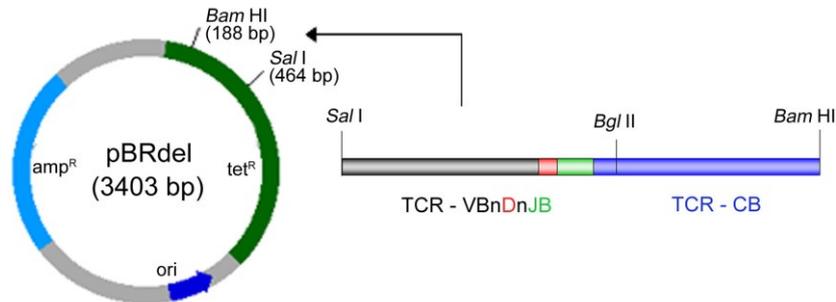


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Subklonierungsvektors pBRdel

Über die *Sal* I- und *Bgl* II-Schnittstellen konnten die rekombinierten LVBnDnJBCB(*Bgl* II)-cDNS-Sequenzen der β -Ketten ausgetauscht werden und wurden dabei in pBRdel mit der Sequenz des konstanten Bereichs (TCR-CB; TCR entspricht TZR) zu vollständig kodierenden TZR β -Ketten verbunden. (aus Schönwetter-Steer, 2005)

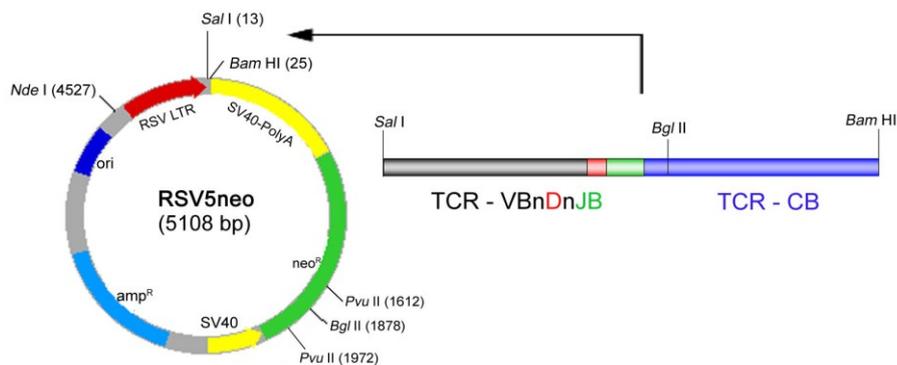
RSV5neo

Abbildung 25: Schematische Darstellung des Expressionsvektors RSV5neo

Aus dem Subklonierungsvektor pBRdel wurden die vollständigen TZR β -cDNS-Sequenzen über die Schnittstellen *Sal* I und *Bam* HI ausgeschnitten und in den Expressionsvektor RSV5neo umklont (TCR entspricht TZR). (aus Schönwetter-Steer, 2005)

9.4 VA-CA-Spektratypisierungen

Das Ergebnis der vorangegangenen VA-CA-Spektratypisierungen ist in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt, die modifiziert nach Schönwetter-Steer (2005) sind.

Abbildung 26: TZR α -Ketten-Spektratypisierung von V β 1⁺-sortierten SFMC 2.5.2.1

Alle neun amplifizierbaren TZR α -Ketten der cDNS von V β 1⁺ SFMC 2.5.2.1 zeigen in der VA-CA-CDR3-Spektratypisierung eine distinkte Spitze, was auf eine monoklonale Expansion der α -Ketten in der T-Zell-Population hinweist. Davon wurden die sechs funktionellen TZR α -Ketten als TZR α ^{ReA}-Kandidaten definiert.

Die Fragment-Analyse stellt auf der Abszisse die Basenpaarlänge und auf der Ordinate die relative Leuchtintensität dar, wobei die Anzahl an Transkripten einer Länge die Leuchtintensität der fluoreszierenden Fragmente beeinflusst.

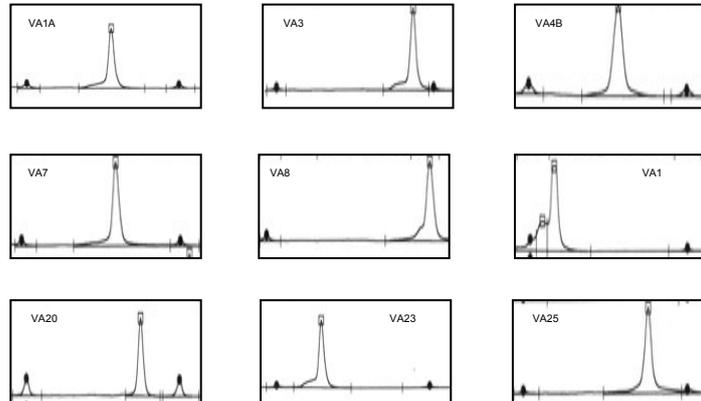
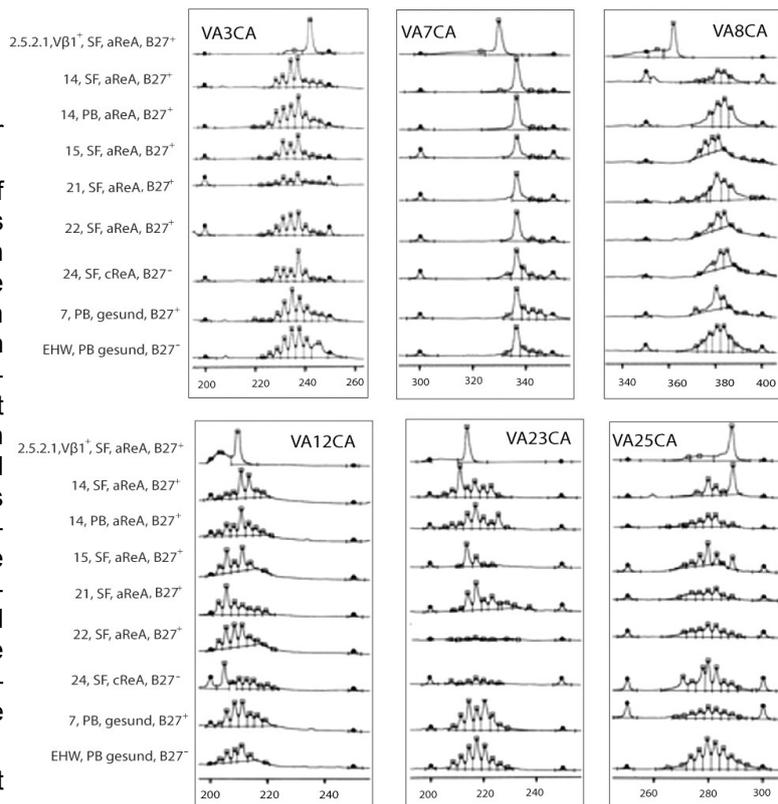


Abbildung 27: VA-CA-CDR3-Spektratypisierung weiterer ReA-Patienten

Die CDR3-Verteilungen der TZR α ^{ReA}-Kandidaten-Ketten wurden in Synovialzellen von fünf weiteren ReA-Patienten und als Kontrolle in Blutlymphozyten zweier Gesunder untersucht. Die Amplifikation wurde mit einem spezifischen VA-Primer gegen einen reversen fluoreszenzmarkierten Primer im CA-Element des TZR durchgeführt und nach Auftrennung im Polyacrylamidgel mit Hilfe eines Sequenzierers detektiert. Zum besseren Größenvergleich wurden die untersuchte cDNS nach VA-Segmenten geordnet auf dem Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetrennt und die bereits vorhandenen V β 1⁺-vorsortierten 2.5.2.1-PCR-Produkte mitgeführt (hier untereinander).

Die Beschreibung der Patienten mit Nummer, Zelltyp (SF: Synovialzellen, PB: Peripheren Blutlymphozyten), Erkrankung (aReA/cReA: akute/chronische Reaktive Arthritis) und HLA-B27 Typisierung (B27⁻/B27⁺) ist jeweils links pro Spur angegeben. Die VA-Genfamilie ist darüber angegeben und gilt jeweils für alle 9 Proben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind Teile der Gele entfernt und nur die entsprechenden 50 bp gezeigt. Die Eingrenzung durch die schwarz-gepunkteten Spitzen stellt den internen Größenstandard 50 - 500 bp dar. Die entsprechende Basenpaarlänge pro VA-Gruppe ist darunter angegeben. Die x-Achse stellt die Basenpaarlänge dar und die y-Achse die Häufigkeit einer bestimmten CDR3-Länge (relative Leuchtintensität der fluoreszierenden Fragmente).



9.5 Sequenzen der isolierten TZR α - und β -Ketten

Aufgeführt sind jeweils die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der sechs TZR α -Kandidaten-Ketten (LVAJACA *Sal I/Pvu II* in RSV5hygro; Sequenz der CA-Region *Pvu II/Bam HI* unter 9.3, Abbildung 23) und die der klontypischen β^{ReA} -Kette LVB1JB2.3CB $^{\text{ReA}}$ (*Sal I/Bam HI* in RSV5neo), wobei das V-Element schwarz, J-Element blau und die C-Region grau aufgeführt sind. Mit Hilfe der gekennzeichneten 5'Primer TRAVL erfolgte ihre Isolierung aus der cDNS ab dem Leaderpeptid (*Sal I* (GTC GAC) für Klonierung). Markierte bzw. unterstrichenen Sequenzelemente sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

LVA3JA28CA:

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide: TRAV3L, VA3, JA28rev; **N-Nukleotide**; *Pvu II* Erkennungssequenz;

GTCGACCATG	GAAACTCTCC	TGGGAGTGTC	TTTGGTGATT	CTATGGCTTC	AACTGGCTAG	60
GGTGAACAGT	CAACAGGGAG	AAGAGGATCC	TCAGGCCTTG	AGCATCCAGG	AGGGTGAAAA	120
TGCCACCATG	AACTGCAGTT	ACAAAACACTAG	TATAAACAAT	TTACAGTGGT	ATAGACAAAA	180
TTCAGGTAGA	GGCCTTGTC	ACCTAATTTT	AATACGTTCA	AATGAAAGAG	AGAAACACAG	240
TGGAAGATTA	AGAGTCACGC	TTGACACTTC	CAAGAAAAGC	AGTTCCTTGT	TGATCACGGC	300
TTCCCGGGCA	GCAGACACTG	CTTCTTACTT	CTGTGCTACG	GAGGGATACT	<u>CTGGGGCTGG</u>	360
<u>GAGTTACCAA</u>	<u>CTCACTTTTCG</u>	<u>GGAAGGGGAC</u>	<u>CAAACCTCTCG</u>	<u>GTCATACCAA</u>	ATATCCAGAA	420
CCCTGACCCT	GCCGTGTACC	AGCTG				

METLLGVSLV	ILWLQLARVN	SQQGEEDPQA	LSIQEGENAT	MNCSYKTSIN	NLQWYRQNSG
RGLVHLILIR	SNEREKHSGR	LRVTLDTSKK	SSLLITASR	AADTASYFCA	TEGYSGAGSY
QLTFGKGTKL	SVIPNIQNPD	PAVYQL			

LVA7JA24CA:

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide: TRAV7L, VA7, JA24rev; **N-Nukleotide**; *Pvu II* Erkennungssequenz;

GTCGACATGT	GGGGAGTTTT	CCTTCTTTAT	GTTTCCATGA	AGATGGGAGG	CACTACAGGA	60
CAAAACATTG	ACCAGCCCAC	TGAGATGACA	GCTACGGAAG	GTGCCATTGT	CCAGATCAAC	120
TGCACGTACC	AGACATCTGG	GTTCAACGGG	CTGTTCTGGT	ACCAGCAACA	TGCTGGCGAA	180
GCACCCACAT	TTCTGTCTTA	CAATGTTCTG	GATGGTTTGG	AGGAGAAAGG	TCGTTTTTCT	240
TCATTCCTTA	GTCGGTCTAA	AGGGTACAGT	TACCTCCTTT	TGAAGGAGCT	CCAGATGAAA	300
GACTCTGCCT	CTTACCTCTG	TGCT GTGAGC	<u>TGGGGGAAAT</u>	<u>TGCAGTTTGG</u>	<u>AGCAGGGACC</u>	360
<u>CAGGTTGTGG</u>	<u>TCACCCAGAG</u>	<u>TATCCAGAAC</u>	<u>CCTGACCCTG</u>	<u>CCGTGTACCA</u>	<u>GCTG</u>	420

MWGVFLLYVS	MKMGGTTGQN	IDQPTEMTAT	EGAIVQINCT	YQTSGFNGLF	WYQQHAGEAP
TFLSYNVLDG	LEEKGRFSSF	LSRSKGYSYL	LLKELQMKDS	ASYLCA VS WG	KLQFGAGTQV
VVTPDIQNPD	PAVYQL				

VA8JA7CA:

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide: TRAV8L, VA8 *Pvu* for (CTG->CTT), VA8, JA7rev; **N-Nukleotide**; *Pvu II* Erkennungssequenz;

GTCGACAGGA	TGACATCCAT	TCGAGCTGTA	TTTATATTCC	TGTGGCTGCA	<u>GCTGGACTTG</u>	60
GTGAATGGAG	AGAATGTGGA	GCAGCATCCT	TCAACCCTGA	GTGTCCAGGA	GGGAGACAGC	120
GCTGTTATCA	AGTGTACTTA	TTCAGACAGT	GCCTCAAAC	ACTTCCCTTG	GTATAAGCAA	180
GAACCTGGAA	AAGGACCTCA	GCTTATTATA	GACATTCGTT	CAAATGTGGG	CGAAAAGAAA	240
GACCAACGAA	TTGCTGTTAC	ATTGAACAAG	ACAGCCAAAC	ATTTCTCCCT	GCACATCACA	300
GAGACCCAAC	CTGAAGACTC	GGCTGTT TTA	<u>AACAGACTCG</u>	<u>CTTTTGGGAA</u>	<u>GGGGAACCAA</u>	360
<u>GTGGTGGTCA</u>	<u>TACCAAATAT</u>	<u>CCAGAACCCT</u>	<u>GACCCTGCCG</u>	<u>TGTACCAGCT</u>	<u>G</u>	

MTSIRAVFIF	LWLQLDLVNG	ENVEQHPSTL	SVQEGDSAVI	KCTYSDSASN	YFPWYKQELG
KGPQLIIDIR	SNVGEKKDQR	IAVTLNKTAK	HFSLHITETQ	PEDSAV LN R	AFGKGNQVVV
IPNIQNPDP A	VYQL				

LVA12JA28CA:

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide: TRAV12L, VA12, JA28rev;
Pvu II Erkennungssequenz; **N-Nukleotide**;

GTCGACAACA	TGCTGACTGC	CAGCCTGTTG	AGGGCAGTCA	TAGCCTCCAT	CTGTGTTGTA	60
TCCAGCATGG	CTCAGAAGGT	AACTCAAGCG	CAGACTGAAA	TTTCTGTGGT	GGAGAAGGAG	120
GATGTGACCT	TGGACTGTGT	GTATGAAACC	CGTGATACTA	CTTATTACTT	ATTCTGGTAC	180
AAGCAACCAC	CAAGTGGAGA	ATTGGTTTTT	CTTATTTCGTC	GGAACCTCTT	TGATGAGCAA	240
AATGAAATAA	GTGGTCGGTA	TTCTTGGAAC	TTCCAGAAAT	CCACCAGTTC	CTTCAACTTC	300
ACCATCACAG	CCTCACAAGT	CGTGGACTCA	GCAGTATACT	TCTGTGCTCT	GAG TGTCCCT	360
<u>GGGGCTGGGA</u>	<u>GTTACCAACT</u>	<u>CACTTTCGGG</u>	<u>AAGGGACCA</u>	<u>AACTCTCGGT</u>	<u>CATACCAAAT</u>	420
ATCCAGAACC	CTGACCCTGC	CGTGTAC	CAG	CTG		

MLTASLLRAV	IASICVVSSM	AQKVTQAQTE	ISVVEKEDVT	LDCVYETRDT	TYLFWYKQP
PSGELVFLIR	RNSFDEQNEI	SGRYSWNFQK	STSSFNFTIT	ASQVVDSAVY	FCAL SVPGAG
SYQLTFGKGT	KLSVIPNIQN	PDPAVYQL			

LVA23JA20CA:

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide:
TRAV23L, VA23 Pvu for (CTG->CTC), VA23, JA20rev;
Pvu II Erkennungssequenz; **N-Nukleotide**;

GTCGACGGAA	TGGAGACCCT	CTTGGGCCTG	CTTATCCTTT	GGCTGCAGCT	GCAATGGGTG	60
AGCAGCAAAC	AGGAGGTGAC	GCAGATTCCT	GCAGCTCTGA	GTGTCCCAGA	AGGAGAAAAC	120
TTGGTTCTCA	ACTGCAGTTT	CACTGATAGC	GCTATTTACA	ACCTCCAGTG	GTTTAGGCAG	180
GACCCTGGGA	AAGGTCTCAC	ATCTCTGTTG	CTTATTCAGT	CAAGTCAGAG	AGAGCAAACA	240
AGTGGAAGAC	TTAATGCCTC	GCTGGATAAA	TCATCAGGAC	GTAGTACTTT	ATACATTGCA	300
GCTTCTCAGC	CTGGTGACTC	AGCCACCTAC	CTCTGTGCTG	TG GTCCTAA	<u>CGACTACAAG</u>	360
<u>CTCAGCTTTG</u>	<u>GAGCCGGAAC</u>	<u>CACAGTAACT</u>	<u>GTAAGAGCAA</u>	ATATCCAGAA	CCCTGACCCT	420
GCCGTGTACC	AGCTG					

METLLGLLIL	WLQLQWVSSK	QEVTVQIPAAL	SVPEGENLVL	NCSFTDSAIY	NLQWFRQDPG
KGLTSLLLIQ	SSQREQTSGR	LNASLDKSSG	RSTLYIAASQ	PGDSATYLCA	VVSN DYKLSF
GAGTTVTVRA	NIQNPDPAVY	QL			

LVA25JA52CA:

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide
TRAV25L, VA25 1Pvu for (CAG->CAA), VA25 2Pvu for (CTG->CTC), VA25, JA52rev;
Pvu II Erkennungssequenz;
N-Nukleotide (bei LVA25JA52CA in RSV5hygro GGGCTAGGG Klon H25.17);

GTCGACAGGA	TGCTCCTTGA	ACATTTATTA	ATAATCTTGT	GGATGCAGCT	GACATGGGTC	60
AGTGGTCAAC	AGCTGAATCA	GAGTCCTCAA	TCTATGTTTA	TCCAGGAAGG	AGAAGATGTC	120
TCCATGAACT	GCACTTCTTC	AAGCATATTT	AACACCTGGC	TATGGTACAA	GCAGGAACCT	180
GGGAAGGTC	CTGTCCTCTT	GATAGCCTTA	TATAAGGCTG	GTGAATTGAC	CTCAAATGGA	240
AGACTGACTG	CTCAGTTTGG	TATAACCAGA	AAGGACAGCT	TCCTGAATAT	CTCAGCATCC	300
ATACCTAGTG	ATGTAGGCAT	CTACTTCTGT	GCT GGGCTGG	GTGCTGGTGG	<u>TACTAGCTAT</u>	360
<u>GGAAAGCTGA</u>	<u>CATTTGGACA</u>	<u>AGGGACCATC</u>	<u>TTGACTGTCC</u>	<u>ATCCAAATAT</u>	<u>CCAGAACCCT</u>	420
GACCCTGCCG	TGTAC	CAGCT	G			

MLLEHLLIIL	WMQLTWVSGQ	QLNQSPQSMF	IQEGEDVSMN	CTSSSIFNTW	LWYKQDPGEG
PVLLIALYKA	GELTSNGRLT	AQFGITRKDS	FLNISASIPS	DVGIYFCAGL	GAGGTSYGKL
TFGQGTILTV	HPNIQNPDPVA	VYQL			

LVB1JB2.3CB2:

Sequenz der klontypischen TZR β^{ReA} -Kette LVB1JB2.3CB ReA ;
die alloreaktive TZR $\beta^{\text{HLA-B27}}$ -Kette LVB1D2JB2.3CB HLA-B27 unterscheidet sich in der CDR3-Region in
den N-Nukleotiden 351-GGG ACT AGC GGC-404 und kodiert die Aminosäuren GTSG;

Unterstrichen sind die Bindestellen folgender Oligonukleotide:

V β 9-Sal, V β 1_neu; J β 2.3; BC290_268;

N-Nukleotide;

Grau markiert sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme in genannter 5'-3'-Reihenfolge:

Sal I, Sac I, Acc I, Xho I, Bgl II, Bam HI;

GTCGACGCCA	TGGGCTTCAG	GCTCCTCTGC	TGTGTGGCCT	TTTGTCTCCT	GGGAGCAGGC	60
CCAGTGGATT	CTGGAGTCAC	ACAAACCCCA	AAGCACCTGA	TCACAGCAAC	TGGACAGCGA	120
GTGACGCTGA	GATGCTCCCC	TAGGTCTGGA	GACCTCTCTG	TGTACTGGTA	CCAACAGAGC	180
CTGGACCAGG	GCCTCCAGTT	CCTCATTGAG	TATTATAATG	GAGAAGAGAG	<u>AGCAAAAAGGA</u>	240
AACATTCTTG	AACGATTCTC	CGCACAAACAG	TTCCCTGACT	TGCACTCTGA	ACTAAACCTG	300
<u>AGCTCTCTGG</u>	<u>AGCTGGGGGA</u>	<u>CTCAGCTTTG</u>	<u>TATTTCTGTG</u>	<u>CCAGCAGCGT</u>	<u>AGGAGTATAC</u>	360
<u>AGCACAGATA</u>	<u>CGCAGTATTT</u>	<u>TGGCCCAGGT</u>	<u>ACCCGGCTGA</u>	<u>CAGTGCTCGA</u>	<u>GGACCTGAAA</u>	420
AACGTGTTCC	CACCCGAGGT	CGCTGTGTTT	GAGCCATCAG	<u>AAGCAGAGAT</u>	<u>CTCCCACACC</u>	480
CAAAAGGCCA	CACTGGTATG	CCTGGCCACA	GGCTTCTACC	CCGACCACGT	GGAGCTGAGC	540
TGGTGGGTGA	ATGGGAAGGA	GGTGCACAGT	GGGGTCAGCA	CAGACCCGCA	GCCCCTCAAG	600
GAGCAGCCCG	CCCTCAATGA	CTCCAGATAC	TGCCTGAGCA	GCCGCCTGAG	GGTCTCGGCC	660
ACCTTCTGGC	AGAACCCCGG	CAACCACTTC	CGCTGTCAAG	TCCAGTTCTA	CGGGCTCTCG	720
GAGAATGACG	AGTGGACCCA	GGATAGGGCC	AAACCCGTCA	CCCAGATCGT	CAGCGCCGAG	780
GCCTGGGGTA	GAGCAGACTG	TGGCTTCACC	TCCGAGTCTT	ACCAGCAAGG	GGTCTGTCT	840
GCCACCATCC	TCTATGAGAT	CTTGCTAGGG	AAGGCCACCT	TGTATGCCGT	GCTGGTCAGT	900
GCCCTCGTGC	TGATGGCCAT	GGTCAAGAGA	AAGGATTCCA	GAGGCTAG	<u>GGATCC</u>	

MGFRLLCVA	FCLLGAGPVD	SGVTQTPKHL	ITATGQRVTL	RCSPRSGDLS	VYWYQQSLDQ
GLQFLIQYYN	GEERAKGNIL	ERFSAQQFPD	LHSELNLSSL	ELGDSALYFC	ASSVGVYSTD
<u>TQYFGPGTRL</u>	<u>TVLE</u> DLKNVF	PPEVAVFEPS	EAEISHTQKA	TLVCLATGFY	PDHVELSWWV
NGKEVHSGVS	TDPQPLKEQP	ALNDSRYCLS	SRLRVSATFW	QNPRNHFRQ	VQFYGLSEND
EWTQDRAKPV	TQIVSAEAWG	RADCGFSTES	YQQGVLSATI	LYEILLGKAT	LYAVLVLSALV
LMAMVKKRDS	RG*				

9.6 Peptide

Die folgenden Antigene wurden in der Arbeitsgruppe und hier analysiert, ob sie von den identifizierten TZR^{ReA}-Kandidaten erkannt werden. Die aufgelisteten Peptide sind HLA-B27-restringiert, stammen vom Proteom von *Chlamydia trachomatis* oder vom menschlichen Protein Aggrecan und wurden als immundominante T-Zell-Epitope beschrieben (Kuon et al., 2001 und 2004). Eine Reaktivität der TZR^{ReA}-Kandidaten nach einer Stimulierung konnte nicht festgestellt werden.

Peptid	Aminosäuresequenz	Referenz
Aggrecan #67 Aggrecanprotein (AS 667 – 675)	SRHHAFCFR	Kuon et al., 2004
<i>Chlamydia</i> #8	NRFSVAYML	Kuon et al., 2001
<i>Chlamydia</i> #68	NRAKQVIKL	Kuon et al., 2001
<i>Chlamydia</i> #131	KRLAETLAL	Kuon et al., 2001
<i>Chlamydia</i> #133	IRSSVQNKL	Kuon et al., 2001
<i>Chlamydia</i> #146	YRLLLTRVL	Kuon et al., 2001
<i>Chlamydia</i> #194	EREQTLNQL	Kuon et al., 2001
<i>Chlamydia</i> #195	NRELIQQEL	Kuon et al., 2001

Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich an dieser Stelle bei allen, die wesentlich dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit erstellen konnte:

In ganz besonderer Weise gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss. Sie gab mir die Möglichkeit meine Arbeit an ihrem Institut anfertigen zu können und begleitete mich in all dieser Zeit mit großem Interesse. Ihr umfassendes Wissen und ihr freundliches Entgegenkommen halfen mir sehr in meinem wissenschaftlichen Arbeiten. Mit unermüdlicher Unterstützung ließ sie mir eine hervorragende Betreuung zukommen.

Meinen besonderen Dank richte ich an PD Dr. Klaus Dornmair. Meine Arbeit profitierte von seinen Methoden und Ideen sowie von seiner Freundlichkeit, Versuche auch in seinem Labor durchführen zu dürfen. Er stand mir zu jeder Zeit äußerst hilfreich mit Rat und Tat zur Seite.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Dornmair, vor allem Anna Niedl, Geraldine Rühl, Joachim Malotka, Ingrid Eiglmeier und Katherina Siewert. Sie halfen mir bei allen Anfragen immer freundlich und mit großer Bereitschaft.

Ich bedanke mich bei den Studierenden Petra Prinz, Charlotte Flynn und Stefan Maßen, die im Rahmen ihrer Diplom-, ihrer Masterarbeit, ihres Praktikums mit mir an diesem interessanten Projekt gearbeitet haben.

Ein herzlicher Dank geht an die zahlreichen „Laborianer“ der Arbeitsgruppe Weiss, die ich im Laufe der Jahre kennen lernen durfte und die mir die Zeit im Labor unvergesslich werden ließen. Besonders danke ich dabei Nicole Rucker für die Einführung ins „Laborleben“. Herzlichst bedanke ich mich bei Stefanie Färberböck, die mich über die Jahre hinweg hilfreich und freundschaftlich begleitet, die Arbeit im Labor bereichert und mir die Promotionszeit insgesamt verschönert hat.

Zutiefst danke ich meinem unschätzbar wertvollen Mitdoktoranden Dr. Christian Schiller. Er trug mit seinem fachkundigen Rat, mit seiner freundschaftlichen Hilfestellung und engagierter Unterstützung insgesamt sehr zum Gelingen meiner Arbeit bei. Ich danke ihm auch für die viele Zeit, in der er mir geduldig zuhörte und mir Anregungen gab, die mir halfen die Arbeit weiterzuentwickeln.

Mein großer Dank gebührt meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglicht und mir in jeglicher Hinsicht geholfen hat, meinen Kindern und vor allem meinen Eltern. Sie waren immer für mich da und haben mich jederzeit liebevoll unterstützt!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach
und in den Nebenfächern
bei der Fakultät für der
(Hochschule/Universität)
unterzogen habe.
- dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den.....

(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen